

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA INABA



**Caracterização funcional da proteína GlnB de *Azospirillum
brasiliense***

**CURITIBA
2009**

JULIANA INABA

**Caracterização funcional da proteína GlnB de *Azospirillum
brasilense***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadores:

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Profa. Dra. Giseli Klassen

CURITIBA
2009

Aos meus pais, Flavio e Vera Lúcia Inaba.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os professores, colegas e amigos do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, em especial ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa, pelo seu exemplo como líder e pesquisador.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Profa. Dra. Giseli Klassen.

Aos membros do Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Bonatto, Prof^a. Dr^a. Luciane Passaglia, Prof. Dr. Hernan Terenzi e Prof^a. Dr^a. Elaine Machado Benelli, pela leitura criteriosa e excelentes sugestões.

À professora e amiga Elaine Machado Benelli.

Aos queridos Valter, Dona Julieta e Dona Roseli Prado pelo apoio técnico que exercem com tanta dedicação e carinho.

Aos professores Dr. Luciano Huergo e Dra. Rose Adele Monteiro pela contribuição científica neste trabalho.

Ao Marco Antônio Kadowaki e Patricia Castellen pelo grande auxílio na purificação de proteínas.

Aos meus amigos queridos por estarem sempre ao meu lado e alegrarem a minha vida.

A todo o grupo do John Innes Centre por terem me disponibilizado toda a estrutura e recursos que possuíam. Em especial ao Dr. Mike Merrick, por ser um exemplo de pesquisador e por ter aceitado me orientar durante o doutorado sanduíche.

Aos amigos do John Innes Centre pela prestatividade, discussões, companheirismo e alegria, em especial à Susan Death, Alexandre Decorps, Steve Pullan, Martha Radchenko, Richard Little, Dr. Ray Dixon e especialmente ao querido amigo Jeremy Thornton, por ter me auxiliado incansavelmente durante o meu estágio de doutoramento.

Ao professor Dr. Mike Merrick e sua esposa, Pam, a Geoff Yates e Ann, e à Fabiane Rego por terem me recebido em sua casa no exterior e me tratado com tanto cuidado e atenção.

Gostaria de agradecer às agências financiadoras deste trabalho, CNPq/MCT, Fundação Araucária, Fundo Paraná de Ciência e Tecnologia, Instituto do Milênio/CNPq/PADCT e, especialmente, à CAPES por me conceder a bolsa PDEE, essencial para a minha formação.

Agradeço imensamente aos meus pais, Flavio e Vera, à minha querida irmã, Caroline Inaba e à pequena bolota, Paulinha, por serem meu alicerce, meus modelos, meu amparo, minha vida. E aos meus tios e primos queridos.

Obrigada a Deus, por me dar força, motivação, alegria e a todos que me cercam, me ensinam, me iluminam.

*O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria.
Armazena suavidade para o amanhã.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma bactéria fixadora de nitrogênio de vida livre, capaz de associar-se a diversas gramíneas e cereais, promovendo crescimento vegetal e aumento de produção. *A. brasilense* apresenta dois genes que codificam proteínas do tipo PII: *glnB* e *glnZ*. As proteínas PII são proteínas homotriméricas transdutoras de sinais que sensoriam os níveis de nitrogênio, carbono e energia na célula e os transmitem para outras proteínas, especialmente para aquelas do sistema de regulação de nitrogênio, Ntr. A proteína GlnD promove a uridililação de GlnB em resposta a baixas concentrações de nitrogênio e o trímero de PII pode ser encontrado na forma mono-, di- ou totalmente uridililada. Proteínas PII também são capazes de ligar-se ao ATP, ADP e 2-oxoglutarato e de formar heterotrímeros, como entre as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*. A expressão de *glnB* e *glnZ* em *A. brasilense* é induzida em condições favoráveis à fixação de nitrogênio e as proteínas codificadas por esses genes controlam a expressão e atividade da nitrogenase neste organismo. Estirpes mutantes *glnB⁻* ou *glnD⁻* de *A. brasilense* não são capazes de fixar nitrogênio, mesmo quando *nifA* é expresso constitutivamente. Os resultados sugerem que NifA encontra-se inativa nestas estirpes e que GlnB-UMP é necessária para ativar NifA. Neste trabalho, a capacidade de GlnB de formar trímeros híbridos mono- ou di-uridililados foi avaliada. A proteína GlnB não foi capaz de formar trímeros parcialmente uridililados ou heretotrímeros com GlnZ ou GlnZ-UMP. Este resultado sugere que as proteínas PII de *A. brasilense* não interagem entre si para modular sua atividade. A capacidade de GlnB ligar-se ao 2-oxoglutarato, ATP, ADP e AMP também foi avaliada e os resultados sugerem que GlnB apresenta 3 sítios de ligação para 2-oxoglutarato com diferentes afinidades e cooperatividade negativa. GlnB também possui alta afinidade de ligação ao ATP e não foi capaz de ligar-se ao ADP ou ao AMP na presença de 2-oxoglutarato. Na ausência de 2-oxoglutarato houve um aumento da afinidade de ligação de ADP à GlnB. Proteínas mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de *A. brasilense* não foram capazes de ativar a síntese da nitrogenase neste organismo, indicando que os resíduos mutagenizados são importantes para a atividade de GlnB. As proteínas mutantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em heparina e a formação de trímeros, uridililação por GlnD e de ligação ao ATP e 2-oxoglutarato foi avaliada. As proteínas GlnBY51F e GlnBV100A, mas não GlnBL13P, apresentaram perfil de migração em gel nativo

semelhante ao da proteína selvagem GlnB, indicando que o resíduo L13 é importante para a manutenção da estrutura trimérica de GlnB. As proteínas GlnBY51F e GlnBL13P não foram uridililadas por GlnD e GlnBV100A apresentou taxa de uridililação menor quando comparada à GlnB com somente 25% dos monômeros de GlnBV100A uridililados após 60 minutos de reação. A afinidade de GlnBV100A e GlnBY51F ao 2-oxoglutarato foi semelhante à da proteína selvagem. Porém a substituição V100A levou à queda de afinidade de ligação de ATP, sugerindo que o resíduo V100 é importante para a ligação de ATP à proteína GlnB de *A. brasilense*. Os resultados mostram que a substituição de um único resíduo na proteína GlnB de *A. brasilense* é suficiente para alterar sua atividade.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a free-living nitrogen-fixing bacterium, which associates with several grasses and cereals and promotes beneficial effects on plant growth and crop yield. *A. brasilense* contains two genes coding for PII like proteins: *glnB* and *glnZ*. PII proteins are homotrimers which act as signal transducers sensing the nitrogen, carbon and energy status and relaying these signals to their targets, especially proteins involved in the general nitrogen regulatory (Ntr) system. The GlnD protein promotes PII uridylylation at low levels of nitrogen and the trimer of PII can be found in the mono-, di- or tri-uridylylated forms. PII proteins are also able to bind ATP, ADP and 2-oxoglutarate which signal the energy and carbon content in the cell and to form heterotrimer such as those between the GlnB and GlnK proteins of *Escherichia coli*. In *A. brasilense* the expression of *glnB* and *glnZ* are induced under nitrogen fixing conditions and the PII proteins control both the expression and the activity of the nitrogenase enzyme. *glnB*⁻ or *glnD*⁻ mutant strains of *A. brasilense* are not capable of fixing nitrogen even when *nifA* is expressed constitutively in these mutant. The result suggests that NifA was inactive in these strains and that GlnB-UMP is required for NifA activity. In this work we showed that the GlnB protein of *A. brasilense* is not capable of forming partially uridylylated trimers or heterotrimers with GlnZ or GlnZ-UMP. GlnB has 3 binding sites to 2-oxoglutarate with different affinities and presenting negative cooperativity. GlnB has high affinity for ATP binding. GlnB was not able to bind neither ADP nor AMP in the presence of 2-oxoglutarate. In the absence of 2-oxoglutarate GlnB bound to ADP suggesting that 2-oxoglutarate modulates ADP binding. The mutant proteins GlnBL13P, GlnBV100A and GlnBY51F were not capable of activating NifA in *A. brasilense*, suggesting that the mutagenised residues are important for GlnB activity. All the mutated proteins were purified using a heparin column and their ability to form trimeric structures, of being uridylylated by GlnD and to bind ATP and 2-oxoglutarate were evaluated. The GlnBY51F and GlnBV100A, but not GlnBL13P, had the same electrophoretic profile on NATIVE-PAGE as wild type GlnB, suggesting that the L13 residue is important to maintain GlnB trimeric structure. The GlnBY51F and GlnBL13P proteins were not capable of being uridylylated by GlnD and GlnBV100A had a decreased rate of uridylylation when compared to the wild type: only 25% of the GlnBV100A trimer were uridylylated after 60 minutes. The ability of GlnBY51F and GlnBV100A to bind ATP and 2-oxoglutarate was evaluated and there was no significant difference of 2-oxoglutarate

binding as compared to the wild type GlnB, but ATP binding was altered in GlnBV100A mutant, suggesting that the V100 residue is important for ATP binding at GlnB. Together the results show that a single substitution in GlnB can alter its activity.

.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Estrutura tridimensional da proteína GlnK de <i>E. coli</i>	20
FIGURA 2-	Estrutura e ciclo catalítico da nitrogenase em <i>A. vinelandii</i>	30
FIGURA 3-	Regulação da atividade de NtrC em resposta aos níveis de Nitrogênio.....	34
FIGURA 4-	Sistema Ntr de <i>A. brasilense</i>	37
FIGURA 5-	Regulação pós traducional da atividade da nitrogenase.....	40
FIGURA 6-	Modelo de regulação pós-traducional da nitrogenase em <i>A. brasilense</i>	42
FIGURA 7-	Estratégia de construção do mutante <i>glnBY51F</i> de <i>A. brasilense</i>	51
FIGURA 8-	Atividade da nitrogenase em <i>A. brasilense</i> estirpes FP2 e LFH3 expressando as proteínas GlnB e GlnBY51F.....	62
FIGURA 9-	Expressão de GlnB, GlnBY51F e NifH em <i>A. brasilense</i>	64
FIGURA 10-	Alinhamento da sequência de aminoácidos de proteínas do tipo PII.....	66
FIGURA 11-	Eletroforese dos extratos protéicos de <i>E. coli</i> BL21 λDE3 expressando as proteínas GlnBV100A, GlnBY51F e GlnBL13P.....	67
FIGURA 12-	Perfil eletroforético das frações eluídas durante a purificação das proteínas GlnBY51-F, GlnBV100A, GlnBL13P e GlnB de <i>A. brasilense</i>	69
FIGURA 13-	Perfil eletroforético da proteína GlnB purificada de <i>A. brasilense</i>	70
FIGURA 14-	Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de frações agrupadas e dialisadas da proteína GlnBY51-F de <i>A. brasilense</i>	71
FIGURA 15-	Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de frações agrupadas e dialisadas da proteína GlnBV100A de <i>A. brasilense</i>	72
FIGURA 16-	Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de frações agrupadas e dialisadas da proteína GlnBL13P de <i>A. brasilense</i>	73
FIGURA 17-	Teste de indução de expressão de GlnB e eficiência do tratamento térmico na etapa de pré-purificação de GlnB.....	75
FIGURA 18-	Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação da proteína GlnB de <i>A. brasilense</i>	77
FIGURA 19-	Perfil de migração em gel nativo da proteína GlnB de <i>A. brasilense</i> purificada.....	78
FIGURA 20-	Comparação do perfil de uridililação das proteínas GlnB purificadas com e sem tratamento térmico	79
FIGURA 21-	Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das frações eluídas durante a purificação da proteína GlnBV100A e GlnB13P de <i>A. brasilense</i>	80
FIGURA 22-	Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das frações eluídas durante a purificação e após tratamento térmico da proteína GlnBY51F de <i>A. brasilense</i>	82
FIGURA 23-	Perfil de migração em gel nativo das proteínas GlnB de <i>A.</i>	

	<i>brasiliense</i> e de suas mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F.....	84
FIGURA 24-	Análise por espectrometria de massa MALDI-TOF do produto de uridililação da proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i>	86
FIGURA 25-	As proteínas GlnB e GlnZ <i>A. brasiliense</i> não formam trímeros híbridos.....	90
FIGURA 26-	Análise por eletroforese nativa dos produtos de uridililação <i>in vitro</i> das proteínas GlnB, GlnBY51F, GlnBV100A, GlnBL13P de <i>A. brasiliense</i>	93
FIGURA 27-	Análise por espectrometria de massa maldi-tof dos produtos das reações de uridililação das proteínas GlnB selvagem e mutantes de <i>A. brasiliense</i>	94
FIGURA 28-	Comparação do modelo estrutural da proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i> com a estrutura de GlnK de <i>E. coli</i>	96
FIGURA 29-	Modelos estruturais das proteínas GlnB selvagem e mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de <i>A. brasiliense</i>	99
FIGURA 30-	Comparação entre os modelos estruturais das proteínas GlnB selvagem e mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de <i>A. brasiliense</i>	101
FIGURA 31-	Efeito da mutagênese L13P, Y51F e V100A no modelo estrutural da proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i>	102
FIGURA 32-	Titulação isotérmica calorimétrica da ligação de 2-oxoglutarato à proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i>	108
FIGURA 33-	Titulação isotérmica calorimétrica da ligação de ATP à proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i>	109
FIGURA 34-	Titulação isotérmica calorimétrica da ligação de ADP à proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i>	110
FIGURA 35-	Titulação isotérmica calorimétrica da ligação de AMP à proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i>	111
FIGURA 36-	Comparação da variação de calor gerada pelas ligações de ATP, ADP, AMP e 2-oxoglutarato na proteína GlnB de <i>A. brasiliense</i>	112
FIGURA 37-	Comparação da variação de calor gerada pelas ligações de 2-oxoglutarato nas proteínas GlnB, GlnBV100A e GlnBY51F de <i>A. brasiliense</i>	113
FIGURA 38-	Comparação da variação de calor gerada pelas ligações de ATP nas proteínas GlnB, GlnBV100A e GlnBY51F de <i>A. brasiliense</i>	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Lista de Plasmídeos.....45

TABELA 2- Antibióticos..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	-	5' difosfato de adenosina
Amp ^r	-	resistência a ampicilina
ATase	-	enzima adenililtransferase
ATP	-	5' trifosfato de adenosina
D.O.	-	densidade óptica
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	-	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
DraG	-	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	-	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
EDTA	-	ácido etilenodiamino-tetra acético
GDH	-	glutamato desidrogenase
GlnB-UMP	-	proteína GlnB uridililada
GlnB-UMP ₁	-	proteína GlnB monouridililada
GlnB-UMP ₂	-	proteína GlnB diuridililada
GlnB-UMP ₃	-	proteína GlnB triuridililada
GlnZ-UMP	-	proteína GlnZ uridililada
GlnZ-UMP ₁	-	proteína GlnZ monouridililada
GlnZ-UMP ₂	-	proteína GlnZ diuridililada
GlnZ-UMP ₃	-	proteína GlnZ triuridililada
GLU	-	glutamato
GOGAT	-	glutamato sintase
GS	-	glutamina sintetase
GS-AMP	-	proteína GS adenililada
IPTG	-	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
kΩ	-	quilo ohms
kb	-	quilobase
Km ^r	-	resistência a canamicina
kV	-	quilo volts
L	-	litro
m/v	-	massa por volume
Mpb	-	mega pares de base
N ₂ ase	-	nitrogenase
NAD ⁺	-	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	-	nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	-	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	-	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
Nal ^r	-	resistência a ácido nalidíxico
NifH-ADP	-	proteína NifH-ADP-ribosilada
NtrC-P	-	proteína NtrC fosforilada
pb	-	pares de base
PCR	-	reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	1
1.1.1 As proteínas da família PII.....	2
1.1.1.1.Estrutura das proteínas do tipo PII.....	4
1.1.1.2. Uridililação das Proteínas PII.....	6
1.1.1.3. Ligação de moléculas efetoras às proteínas PII.....	8
1.1.1.4. Formação de heterotrímeros entre as proteínas PII.....	10
1.1.2. Metabolismo de Nitrogênio em bactérias.....	11
1.1.2.1 Captação de Amônio.....	11
1.1.2.2. Fixação Biológica de nitrogênio.....	13
1.1.2.3. Assimilação de amônio.....	16
1.1.2.4 Sistema de regulação de nitrogênio (Ntr).....	17
1.1.2.4.1. Regulação da atividade de NtrC.....	18
1.1.2.4.2. Regulação transcricional dos genes <i>nif</i>	20
1.1.2.4.3. Regulação pós-traducional da atividade de nitrogenase.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1. Bactérias.....	30
4.2. Plasmídeos.....	30
4.3. Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	31
4.4. Antibióticos.....	33
4.5. Reagentes.....	33
4.6. Técnicas de Biologia Molecular.....	34
4.7. Sequenciamento de DNA.....	34
4.8. Determinação da Concentração de Proteínas.....	34
4.9. Mutagênese sítio dirigida do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i>	34
4.10. Subclonagem dos genes <i>glnB</i> e <i>glnBY51F</i> no vetor pLAFR3.18.....	37
4.11. Subclonagem dos genes <i>glnB</i> , <i>glnBL13P</i> , <i>glnBV100A</i> e <i>glnBY51F</i> nos vetores pET29.....	37
4.12. Conjugação bacteriana.....	37
4.13. Determinação da atividade de nitrogenase em <i>A. brasilense</i>	38
4.14. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturante (SDS-PAGE).....	38
4.15. Imunodeteção das proteínas GlnB selvagem e mutantes, NifA e NifH de <i>A. brasilense</i>	39
4.16. Superexpressão e purificação das proteínas GlnB, GlnBV100A, GlnBL13P e GlnBY51F de <i>A. brasilense</i>	40

4.16.1. Teste de indução de expressão das proteínas GlnB de <i>A. brasilense</i>	40
4.16.2. Teste de eficiência de tratamento térmico para a purificação de GlnB.....	41
4.16.3. Purificação de GlnB selvagem e mutantes de <i>A. brasilense</i>	41
4.17. Ensaio de uridililação das proteínas GlnB, GlnBV100A, GlnBL13P e GlnBY51F de <i>A. brasilense</i>	42
4.18. Eletroforese sob condições nativas.....	42
4.19. Espectrometria de massa MALDI-TOF.....	43
4.20. Modelagem <i>in silico</i> das proteínas GlnB, GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de <i>A. brasilense</i>	44
4.21. Ensaio de desnaturação/renaturação de GlnB e GlnZ de <i>A. brasilense</i>	44
4.22. Determinação das constantes de dissociação das proteínas PII e os efetores 2-oxoglutarato, ATP, ADP e AMP.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1. Efeito da mutação GlnBY51F na ativação da proteína NifA.....	46
5.2. Superexpressão e purificação das proteínas GlnB, GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F.....	50
5.3. Perfil de migração das proteínas GlnB, GlnBL13P, GlnBV100A, GlnBY51F em gel não desnaturante	68
5.4. Estudo da uridililação da proteína GlnB de <i>A. brasilense</i>	69
5.5. Estudo da formação de trímeros híbridos entre as proteínas do tipo PII de <i>A. brasilense</i>	73
5.6. Perfil de uridililação das proteínas mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de <i>A. brasilense</i>	77
5.7. Efeito das substituições dos resíduos L13, V100 e Y51 no modelo estrutural da proteína GlnB de <i>A. brasilense</i>	81
5.8. Determinação das constantes de ligação de ATP, ADP, AMP e 2-oxoglutarato na proteína GlnB de <i>A. brasilense</i>	89
6. CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Azospirillum brasilense*

Azospirillum brasilense é uma bactéria diazotrófica Gram negativa, móvel, pertencente a classe α das Proteobactérias (YOUNG *et al.*, 1992). O gênero *Azospirillum* é composto de 8 espécies que incluem *A. brasilense*, *A. lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMAS *et al.*, 1989), *A. largimobile* (DEKHIL *et al.*, 1997), *A. dobereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001) e *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005). As bactérias deste gênero são globalmente distribuídas, sendo encontradas na rizosfera e em associação às raízes, caule e folhas de uma ampla variedade de plantas (HARTMANN e BALDANI, 2006). Bactérias do gênero *Azospirillum* apresentam capacidade promotora de crescimento vegetal, tendo sido descrita a sua associação com diversas variedades vegetais de interesse econômico como gramíneas, girassol, arroz, tomateiro, tabaco, abacaxi, banana entre outras (BASHAN e HOLGUIN, 1997; WEBER *et al.*, 1999; revisado por HARTMANN e BALDANI, 2006). Alguns estudos mostraram que a inoculação de sementes com *Azospirillum* favorecem o aumento no conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio e outros minerais nas plantas inoculadas, além de gerar um aumento de produtividade de até 30% (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; REDDY e LADHA, 2000; DIDONET *et al.*, 2003). Diversos fatores têm sido associados ao efeito estimulatório promovido pela interação planta-bactéria (JAIN e PATRIQUIN, 1984; BODDEY *et al.*, 1986). Além da capacidade fixadora de nitrogênio de *Azospirillum* (DOBEREINER e DAY, 1976), esse microorganismo é capaz de produzir substâncias promotoras de crescimento vegetal, como fitormônios, auxinas, citocininas e giberelinas (BARBIERI *et al.*, 1993; OKON *et al.*, 1976; BASHAN *et al.*, 1989 e FAGES *et al.*, 1994). Os fitormônios favorecem o aumento da capacidade de absorção de água e nutrientes das plantas inoculadas com *Azospirillum*, possivelmente um resultado de aumento do número e do tamanho de raízes laterais e dos pêlos absorventes das raízes (OKON *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 1983; revisado por STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

Azospirillum spp apresenta um genoma complexo, contendo de cinco a sete megareplicons que variam de 0,65 a 2,6 Mpb. Estes replicons podem ser

considerados cromossomos, uma vez que vários mostraram sinal de hibridização com o gene rDNA 16S (MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000).

Azospirillum spp é capaz de utilizar malato, lactato, succinato e piruvato como fontes de carbono. Algumas espécies ainda podem utilizar frutose e D-glucose com fontes de carbono (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). A incorporação do elemento nitrogênio às biomoléculas das bactérias envolve sua assimilação a partir de diversas fontes como glutamato, glutamina, íons amônio, nitrogênio atmosférico, íons nitrato (NO_3^-) ou íons nitrito (NO_2^-) (REITZER *et al.*, 1996; revisado por ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK., 2001). A assimilação e incorporação de nitrogênio de alguma destas fontes, como o nitrogênio atmosférico, envolve alto gasto energético sendo, portanto, altamente reguladas. Uma das proteínas chave no controle da regulação do metabolismo de nitrogênio e carbono em Proteobactérias são as proteínas da família PII, que na sua maioria são denominadas GlnB e GlnZ/GlnK.

1.1.1 As proteínas da família PII

As proteínas da família PII são transdutoras de sinais amplamente distribuídas e conservadas, que atuam no controle de processos metabólicos centrais nas bactérias (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; FORCHHAMMER *et al.*, 2008). Genes codificadores de proteínas PII foram encontrados em todo o domínio bactéria, em arquea e em eucariotos fototróficos, como algas vermelhas e plantas (HSIEH *et al.*, 1998; FORCHHAMMER *et al.*, 2008). Na grande maioria dos organismos, exceto nas cianobactérias e plantas, foram encontrados dois ou mais genes codificadores de proteínas da família PII, denominados *glnB*, que codifica para GlnB e *glnK* (em *A. brasilense* denominado *glnZ*) que codifica para a proteína GlnK (ou para sua ortóloga GlnZ) (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993 e 1996).

Em geral, a organização estrutural dos operons contendo os genes *glnB* e *glnK* é bastante conservada. Em todos os membros das α -Proteobactéria o gene *glnB* aparece a montante do gene *glnA*, que codifica para a glutamina sintetase. Em diversos organismos, exceto em *A. brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, o gene *glnK* encontra-se localizado a montante do gene *amtB*, que codifica para o transportador de membrana AmtB (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; PERLOVA *et al.*, 2003; DE

ZAMAROCZY *et al.*, 1998). Em *A. brasilense*, o gene *glnZ* é monocistrônico (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998).

O gene *glnB* de *A. brasilense* é expresso a partir de dois promotores dependendo da disponibilidade de íons amônio. Na presença de altas concentrações de amônio *glnB* é expresso a partir de um promotor dependente do fator σ^{70} , enquanto que sob condições limitantes de amônio *glnB* é expressa a partir de um promotor σ^{54} dependente do ativador NtrC (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Nesta condição a expressão de *glnB* é cinco vezes maior do que na presença de excesso de amônio. A expressão do gene *glnZ* de *A. brasilense* também é dependente do fator σ^{54} e dependente do ativador de transcrição NtrC, portanto, regulado por amônio (item 1.1.2.4) (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998; HUERGO *et al.*, 2003). GlnB pode afetar sua própria expressão e a expressão de *glnZ* uma vez que participa da regulação da atividade de NtrB e, conseqüentemente, de NtrC (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998; HUERGO *et al.*, 2003).

As proteínas PII de *A. brasilense*, GlnB e GlnZ apresentam 112 resíduos de aminoácidos e 81% de similaridade entre si (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996). A proteína GlnB apresenta uma massa molecular e pl teóricos de 12371,37 daltons e 6,31, respectivamente, e GlnZ 12272,00 daltons e 6,30 (UniProtKB, <http://www.uniprot.org/uniprot>). Apesar da alta similaridade entre essas proteínas, uma é incapaz de substituir funcionalmente a outra. Vários estudos realizados mostraram que um mutante *glnB*⁻ (7628) de *A. brasilense* foi capaz de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio, apresentou redução da taxa de captação de íons metilamônio, não apresentou atividade de redução de N₂ (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998) e perdeu o controle pós-traducional da nitrogenase (KLASSEN *et al.*, 2005). Por outro lado, um mutante *glnZ*⁻ de *A. brasilense* (7611) foi capaz de fixar nitrogênio, apresentou um aumento de duas vezes no transporte de metilamônio (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998) e deficiência na reativação da nitrogenase (*switch-on*), após adição de íons amônio às culturas desreprimidas (KLASSEN *et al.*, 2001). Esses resultados mostram que uma característica comum entre as proteínas PII são as suas participações nos processos que requerem sensoriamento dos níveis de nitrogênio como: controle de sistemas de captação de fontes alternativas de nitrogênio, controle do transporte de amônio, controle do sistema de assimilação do amônio e controle transcricional e pós-traducional da nitrogenase.

A seguir, serão detalhadas algumas funções das proteínas PII.

1.1.1.1 Estrutura das proteínas do tipo PII

As proteínas do tipo PII apresentam uma sequência de 112 aminoácidos e 12,4 KDa. Uma importante exceção são proteínas do tipo PII de arquea que apresentam nove resíduos a mais em sua estrutura primária (revisado por NINFA e ATKINSON, 2000).

GlnB de *E. coli* foi a primeira das proteínas do tipo PII a ser cristalizada (CHEAH *et al.*, 1994; CARR *et al.*, 1996). As estruturas cristalográficas de diversas proteínas do tipo PII já foram resolvidas e todas elas são encontradas como homotrímeros de elevada semelhança estrutural (YILDIZ *et al.*, 2007). Os monômeros de PII contêm 2 α -hélices e 6 folhas β distribuídas em três motivos: a volta B, compreendendo os resíduos 81-92; a volta T, compreendendo os resíduos 46-51; e a volta C, na porção C-terminal da proteína (revisado por NINFA e ATKINSON, 2000). A estrutura do homotrímero se assemelha a um barril compacto de 30Å de altura, que apresenta um canal central, formado por 6 folhas β antiparalelas. Na interface entre os monômeros encontra-se uma fenda, sítio de ligação de moléculas efetoras, como ATP, MgATP, ADP e, possivelmente, 2-oxoglutarato (XU *et al.*, 1998, 2001; BENELLI *et al.*, 2002; YILDIZ *et al.*, 2007). As voltas T são flexíveis e projetam-se para cima do barril. A ligação de efetores às proteínas PII pode promover alterações conformacionais na volta T, que favorecem a interação com proteínas alvo (JAGGI *et al.*, 1996; CARR *et al.*, 1996; JIANG *et al.* 1997; XU *et al.*, 1998). A volta T apresenta um resíduo altamente conservado, Tyr 51, que é uridililado em baixos níveis de amônio na grande maioria das proteínas PII, com exceção das proteínas PII de *Streptomyces coelicolor* e *Corynebacterium glutamicum*, onde esse resíduo pode ser adenililado, e da PII da cianobactéria *Synechococcus* sp, que pode ser fosforilada no resíduo de serina 49 (HESKETH *et al.*, 2002; STROSSER *et al.*, 2004; FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC *et al.*, 1994; JAGGI *et al.*, 1996). A estrutura da proteína de GlnK de *E. coli* é apresentada na Figura 1.

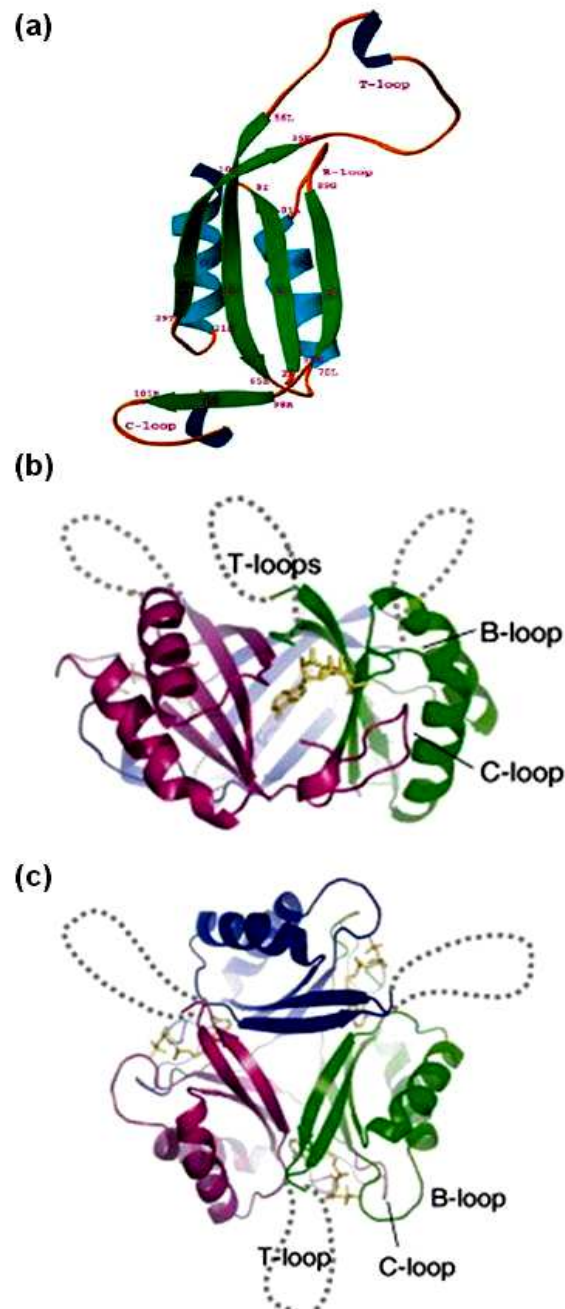


FIGURA 1. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA GlnK DE *E. coli*. Modelo estrutural do monômero de GlnK de *E. coli* (XU *et al.*, 1998). Vista lateral (b) e superior (c) da estrutura trimérica de GlnK de *E. coli* co-cristalizada com ATP (PDB: 2 *glnk*; [HTTP://www.pdb.org](http://www.pdb.org); XU *et al.*, 1998). As subunidades de GlnK são apresentadas em rosa, verde e azul, e o ATP em amarelo. Os loops T, C e B são apresentados. FONTE: adaptado de Forchhammer (2008).

1.1.1.2 Uridililação das Proteínas PII

A uridililação das proteínas PII é uma reação catalisada pela proteína GlnD e ocorre em um resíduo altamente conservado, Tyr51, em resposta à variação intracelular de amônio. A proteína GlnD é uma proteína bifuncional com atividade de uridililtransferase/enzima removedora de uridilil (UTase/UR), e é considerada um sensor dos níveis de nitrogênio intracelular, que é refletido pela relação glutamina/2-oxoglutarato (revisado por MERRICK e EDWARDS, 1995). Em baixos níveis de amônio, quando a relação glutamina/2-oxoglutarato é baixa, a proteína PII é uridililada no resíduo tirosina 51. De forma contrária, altos níveis de amônio (alta relação glutamina/2-oxoglutarato) levam à desuridililação da proteína PII, também catalisada por GlnD (ENGLEMAN e FRANCIS, 1978). A uridililação/desuridililação de PII é dependente da presença de ATP e 2-oxoglutarato, sendo que a remoção do grupamento UMP é estimulada pela presença de glutamina (ENGLEMAN e FRANCIS, 1978).

Genes codificadores de proteínas GlnD foram encontrados em diversos organismos e essa proteína parece ser essencial para a viabilidade celular, uma vez que, freqüentemente, não foi possível a obtenção de formas viáveis destes mutantes em diversos organismos, como em *K. pneumoniae* e *Corynebacterium glutamicum*, a não ser que fossem inseridas mutações secundárias espontâneas (EDWARDS e MERRICK, 1995; JAKOBY *et al.*, 1999; COLNAGHI *et al.*, 2001). Em *E. coli* e *Rhizobium tropici*, *glnD* é monocistrônico e sua expressão é baixa e não regulada por íons amônio (KAMBEROV *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1998; O'CONNELL *et al.*, 1998). Em *A. brasilense*, *glnD* também parece ser monocistrônico e de expressão relativamente alta, mesmo na presença de amônio (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). Embora não tenham sido encontrados sítios de ligação para NtrC a montante do gene *glnD*, a expressão de *glnD* aumenta na ausência de nitrogênio, sugerindo ser dependente do sistema regulação de nitrogênio (Ntr) em *A. brasilense* (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002).

As proteínas GlnD apresentam atividade bem conservada, de modo que *glnD* de *A. vinelandii* é capaz de complementar um mutante *glnD*⁻ de *E. coli* e *K. aerogenes* e, da mesma maneira, *glnD* de *E. coli* foi capaz de complementar um mutante *glnD*⁻ de *A. vinelandii* (CONTRERAS *et al.*, 1991). Além disso, a proteína GlnD de *E. coli* purificada foi capaz de promover a uridililação e desuridililação *in*

vitro das proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* e GlnB e GlnZ de *A. brasilense* (BONATTO *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2008).

As proteínas do tipo PII, em geral, podem ser encontradas como trímeros livre, mono, di ou tri-uridililados (BONATTO *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2008) e sua modificação covalente é importante para direcionar sua interação com proteínas alvo, como DraT, DraG, AmtB, NtrB e NifA (HUERGO *et al.*, 2006, 2007 e 2009; VAN DOMMELLEN *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2006). Alguns estudos indicam que o trímero de GlnB não precisa estar completamente uridililado para sinalizar os níveis de nitrogênio para suas proteínas alvo. Quando as proteínas GlnB não modificada, GlnB-UMP₃ e um mutante GlnB contendo uma deleção da alça T (resíduos 47-53) foram misturadas, desnaturadas e renaturadas, foram encontrados trímeros híbridos mono, di e triuridililados entre essas proteínas (JIANG *et al.*, 1997). A proteína trimérica contendo apenas uma alça T foi capaz de interagir com os alvos de GlnB, regulando a atividade de NtrB e de GlnE (ATase) (JIANG *et al.*, 1997).

A uridililação das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* foi extensamente estudada (ARAÚJO *et al.*, 2008). Quando as proteínas PII de *A. brasilense* são uridililadas por GlnD deste organismo, a uridililação de GlnZ é mais lenta quando comparada à GlnB e sempre é parcial, mesmo após uma hora de incubação na presença de 100 nmol/L de GlnD. Nas mesmas condições experimentais, a uridililação total de GlnB ocorreu após 30 minutos de reação (ARAÚJO *et al.*, 2008). Esse fenômeno também foi observado quando GlnZ foi uridililada pela proteína GlnD de *E. coli* purificada (ARAUJO *et al.*, 2008). De forma semelhante, a proteína GlnK de *E. coli* também sofreu uridililação parcial com um máximo de 2,5 monômeros uridililados (ATKINSON e NINFA, 1999). A proteína GlnB de *H. seropedicae* também é uridililada mais eficientemente do que GlnK, embora, diferentemente de *E. coli* e *A. brasilense*, sua uridililação seja total (BONATTO *et al.*, 2007).

Quatro bandas podem ser resolvidas em um gel de eletroforese nativo do produto de uridililação parcial da proteína PII. Estas bandas correspondem ao trímero livre, e as formas mono, di e tri-uridililadas. O acréscimo de um resíduo UMP, carregado, leva a um aumento de migração do trímero no gel nativo (FORCHHAMMER, 1994). Esse perfil foi evidenciado na uridililação de GlnZ. Entretanto, ele não foi observado na uridililação parcial de GlnB de *A. brasilense*. Nesta proteína somente foram evidenciadas a presença de duas bandas (HUERGO *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2008). Os autores sugeriram, então, que a uridililação

de GlnB ocorreria de forma cooperativa, como em *E. coli*, de forma que a adição de um primeiro grupamento UMP levasse à rápida adição dos outros dois grupamentos, não podendo serem identificadas pelo método empregado as formas mono e di-uridililadas (HUERGO *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2008).

Huergo e colaboradores (2006) mostraram que a adição de amônio às culturas de *A. brasilense* crescidas em condições de fixação de nitrogênio leva à rápida desuridililação das proteínas PII, GlnB e GlnZ. Esse processo ocorre de forma mais rápida para a proteína GlnZ, e a desuridililação de GlnB não foi completa. Após o consumo do amônio adicionado, as proteínas PII são novamente uridililadas. A desuridililação de GlnZ ocorreu 12 minutos após a adição de amônio (200 $\mu\text{mol/L}$) e foi completa após 20 minutos, enquanto que a desuridililação de GlnB se iniciou 15 minutos após o consumo de amônio, mas não foi completa mesmo após 20 minutos. A diferença na taxa de uridililação e desuridililação entre as proteínas do tipo PII de *A. brasilense* pode ser importante para a função dessas proteínas.

1.1.1.3 Ligação de moléculas efetoras às proteínas PII

As proteínas PII são transdutoras de sinais de carbono, amônio e energia, que, na célula, correspondem à concentração de 2-oxoglutarato, glutamina e ATP/ADP, respectivamente (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). Em altos níveis de amônio, a concentração de glutamina aumenta, enquanto que a concentração de 2-oxoglutarato diminui. Em baixos níveis de amônio o inverso ocorre: aumenta a concentração de 2-oxoglutarato, enquanto ocorre diminuição da concentração de glutamina (KUSTU *et al.*, 1984; SENIOR *et al.*, 1975). As interações das proteínas do tipo PII com suas moléculas alvo respondem e dependem da variação da concentração destes sinais (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001).

A concentração de glutamina intracelular é sensorizada por GlnD que promove a uridililação de PII (KAMBEROV *et al.*, 1995). Em baixos níveis de glutamina, a atividade transferásica de GlnD é acionada e PII é uridililada. Em altos níveis de glutamina, GlnD interage com este metabólito, ativando a remoção do grupamento UMP de PII. A uridililação de PII depende da presença ATP e 2-oxoglutarato em *E. coli*, *A. brasilense* e *H. seropedicae*, entre outros (KAMBEROV *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2008; BONATTO *et al.*, 2007).

Ao contrário da glutamina, os sinais intracelulares de carbono são sensorizados diretamente pela ligação de 2-oxoglutarato à PII (KAMBEROV *et al.*, 1995). Embora a variação dos níveis intracelular de 2-oxoglutarato em resposta às variações de nitrogênio (faixa 0,1- 0,9 mmol/L) não chegue a influenciar a modificação covalente de PII por GlnD (SENIOR, 1975; KAMBEROV *et al.*, 1995), a ligação deste efetor a PII modula a sua interação direta com proteínas alvo, como NtrB (JIANG *et al.*, 1998).

Em *E. coli*, a proteína PII apresenta 3 sítios de ligação para 2-oxoglutarato e 3 sítios de ligação para ATP (JIANG e NINFA, 2007). A ligação destas moléculas à GlnB ocorre de maneira sinérgica. Três moléculas de ATP ligam-se fortemente à PII, embora sua afinidade seja reduzida em baixos níveis (50 $\mu\text{mol/L}$) de 2-oxoglutarato ($K_{d1}=5 \mu\text{mol/L}$, $K_{d2}=53 \mu\text{mol/L}$, $K_{d3}= 1000 \mu\text{mol/L}$), quando compara à sua ligação em altos níveis (2 mmol/L) deste composto ($K_{d1}=0,36 \mu\text{mol/L}$, $K_{d2}=30 \mu\text{mol/L}$, $K_{d3}= 300 \mu\text{mol/L}$) (JIANG e NINFA, 2007). Estudos recentes mostraram que o ADP também é capaz de se ligar à PII e parece competir pelo mesmo sítio de ligação de ATP. Desta maneira, PII poderia atuar, também, monitorando os níveis energéticos na célula (JIANG e NINFA, 2007). Quando a ligação de 2-oxoglutarato à PII foi avaliada na presença de ATP, três sítios de ligação foram encontrados, com afinidades de $K_{d1}=12 \mu\text{mol/L}$, $K_{d2}=120 \mu\text{mol/L}$, $K_{d3}= 5000 \mu\text{mol/L}$, desta forma, quando uma primeira molécula de 2-oxoglutarato liga-se fortemente à GlnB, essa ligação promove uma forte cooperatividade negativa para a ligação de uma segunda molécula de 2-oxoglutarato (JIANG e NINFA, 2007). A ligação de 2-oxoglutarato promove alterações conformacionais em GlnB regulando sua interação com diferentes alvos celulares, como as proteínas ATase e NtrB (JIANG *et al.*, 1998, 1999, JIANG e NINFA, 2007). Baixos níveis de 2-oxoglutarato favorecem a interação GlnB-NtrB, independentemente da uridililação de GlnB (JIANG *et al.*, 1998). Entretanto, quando GlnB encontra-se saturada com 2-oxoglutarato, ela é incapaz de interagir com NtrB, mostrando que o sinal de carbono também direciona a interação de PII com proteínas alvo (NINFA e ATKINSON, 2000).

Glutamina, 2-oxoglutarato e GlnB também participam do controle da atividade de GS (glutamina sintetase) por adenililação em *E. coli* (JIANG *et al.*, 1998c). A proteína GlnB não modificada ativa a transferência de um grupamento adenilil à GS, catalisada por ATase, inativando-a. De forma reversa, a presença de GlnB-UMP (em baixos níveis de glutamina) é necessária para estimular a atividade removedora de

adenilil da ATase, ativando GS (JIANG *et al.*, 1998c). Além do controle pelo estado de uridililação de GlnB, a ligação de 2-oxoglutarato à GlnB impede a sua interação com a ATase, inibindo a sua atividade de adenilil transferase (JIANG *et al.*, 1998c). A glutamina por si só, mesmo em baixas concentrações, promove a adenililação de GS, ligando-se diretamente na ATase e a presença de GlnB é necessária para prevenir esse efeito (JIANG *et al.*, 1998c). Desta maneira ocorre a integração de sinais metabólicos, sendo que o efeito do carbono pode se sobrepor sobre o efeito do nitrogênio em determinadas situações (NINFA e ATKINSON, 2000).

1.1.1.4 Formação de heterotrímeros entre as proteínas PII

A formação de heterotrímeros entre proteínas PII de *E. coli*, GlnB e GlnK, foi mostrada por Van Heeswijk e colaboradores (2000). Um extrato celular de uma cultura crescida em meio contendo baixos níveis de amônio foi submetido à eletroforese não desnaturante e análise por imunodeteção de proteínas PII. Foram identificadas a presença de bandas de migração intermediárias e distintas da migração das formas livres e uridililadas de GlnB ou GlnK, sugerindo a formação de trímeros híbridos GlnB-UMP/GlnK-UMP (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000).

A formação de heterotrímeros também foi demonstrada *in vitro* utilizando um protocolo de desnaturação e renaturação de proteínas PII (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). Os resultados mostraram que a taxa de formação de homotrímeros ou heterotrímeros entre as proteínas GlnB e GlnK era equivalente e a formação de heterotrímeros não é dominante (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). Isso se dá, provavelmente, devido à presença, em ambas as proteínas, dos resíduos críticos para a estabilização da estrutura trimérica: Val30, Lys34 e Glu32 (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000).

A capacidade dos heterotrímeros, comparada ao homotrímero, em ativar a proteína GS foi avaliada *in vitro* (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). A presença de GlnB-UMP, mas não GlnK-UMP, foi capaz de estimular a deadenililação de GS-AMP, ativando-a. Os heterotrímeros GlnB-UMP/GlnK-UMP (nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1) mantiveram a capacidade de estimular a deadenililação de GS-AMP, embora apresentassem menor eficiência comparado ao homotrímero GlnB-UMP. Esses resultados levaram os autores a sugerir que a formação de heterotrímeros é

necessária para um controle fino da atividade de proteínas alvo, tais como de GS e de NtrB (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000).

A formação de heterotrímeros também foi mostrada quando GlnB de *Synechococcus* foi expressa em *E. coli*. Esta proteína foi capaz de formar heterotrímeros tanto com GlnB, quanto com GlnK de *E. coli*, embora esses heterotrímeros não fossem ativos (FORCHAMMER, 1999).

1.1.2 O metabolismo de Nitrogênio em bactérias

O nitrogênio é elemento fundamental para a síntese de importantes biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. As bactérias desenvolveram mecanismos de utilização de diversas fontes de nitrogênio, como amônio, glutamina, glutamato, aminoácidos, NO_3^- e NO_2^- , além do dinitrogênio atmosférico (REITZER *et al.*, 1996). Alguns destes compostos podem ser diretamente assimilados, como é o caso da glutamina e glutamato. Outros, como o NO_3^- , NO_2^- e N_2 devem ser primeiramente reduzidos para, então, serem assimilados (REITZER *et al.*, 1996). A seguir, serão apresentados os sistemas de captação de amônio, assimilação de dinitrogênio atmosférico (fixação biológica do nitrogênio) e assimilação do amônio em bactérias, com foco em *A. brasilense*.

1.1.2.1 Captação de Amônio

Em condições de baixo nitrogênio, *Azospirillum brasilense* apresenta um sistema capaz de captar traços de íons amônio (NH_4^+), de forma dependente de energia, e recaptar amônia (NH_3) que vaza por difusão pela membrana, a partir do interior celular (HARTMANN e KLEINER, 1982). O transportador de amônio, AmtB, apresenta grande afinidade por amônio ($K_m=5 \mu\text{mol/L}$) e também é capaz de transportar o seu análogo radioativo, metilamônio, embora com menor afinidade ($K_m= 50 \mu\text{mol/L}$) (HARTMANN e KLEINER, 1982).

A inativação de um gene *amtB* de *A. brasilense* levou à perda de sua capacidade de transportar metilamônio e à deficiência no crescimento em meio contendo baixos níveis de nitrogênio (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). Embora o crescimento em baixos níveis de amônio fosse deficiente neste mutante, ele não foi

completamente inibido, o que levou aos autores a sugerir a presença de um segundo transportador de amônio neste organismo (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998).

A proteína AmtB de *E. coli* apresenta 11 hélices transmembrana que formam um canal e uma porção C-terminal, voltada para o meio intracelular (THOMAS *et al.*, 2000; MARINI e ANDRE, 2000). Em *A. brasilense*, o modelo estrutural sugere que AmtB apresenta 12 hélices transmembranas (VAN DOMMELEN, *et al.*, 1998).

O gene *amtB* é monocistrônico e dependente do fator σ^{54} da RNA polimerase, e NtrC fosforilada (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). Diferentemente do que ocorre em enterobactérias, o gene *amtB* de *A. brasilense* não é co-transcrito com gene de proteínas do tipo PII, embora tenha sido mostrado que mutantes *glnZ* apresentam deficiência no transporte de metilamônio, indicando que esta proteína participa da regulação da atividade de AmtB (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998). De fato, foi comprovado que tanto a proteína GlnB, quanto a proteína GlnZ de *A. brasilense* são capazes de ligar à membrana celular após choque de amônio, de maneira dependente de AmtB (HUERGO *et al.*, 2006). A ligação de GlnZ à AmtB envolve também o sequestro de DraG, proteína envolvida na regulação da atividade da nitrogenase por íons amônio (HUERGO *et al.*, 2007). Esse sistema parece estar envolvido no controle pós-traducional da nitrogenase, que será visto no item 1.1.2.4.3.

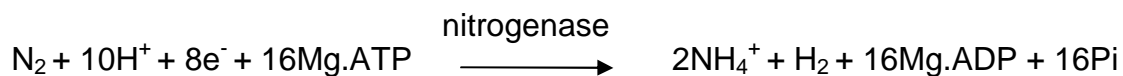
O sequestro de proteínas do tipo PII em resposta às variações dos níveis de amônio foi primeiramente demonstrado em *E. coli* e *A. vinelandii* por Coutts e colaboradores (2002), e a ligação de GlnK à AmtB é importante para o controle da sua atividade (JAVELLE *et al.*, 2004). Um mutante GlnKY51F, incapaz de ser uridililado, não foi capaz de se dissociar de AmtB quando em baixos níveis de amônio, sugerindo que a uridililação de GlnK é importante para direcionar a interação GlnK-AmtB (JAVELLE *et al.*, 2004). Recentemente, a estrutura cristalográfica do complexo AmtB-GlnK foi determinada (CONROY *et al.*, 2007; GRUSWITZ *et al.*, 2007). GlnK é capaz de se ligar à AmtB na sua forma trimérica, bloqueando o canal de amônio (GRUSWITZ *et al.*, 2007). A interação de GlnK com AmtB ocorre via alças T, de modo que quando GlnK encontra-se uridililada, ocorre um impedimento estérico para sua ligação à AmtB (GRUSWITZ *et al.*, 2007). A interação de GlnK-AmtB também é regulada pelos níveis de 2-oxoglutarato e pela relação ATP/ADP, conforme descrito no item 1.1.2.4.3 (GRUSWITZ *et al.*, 2007). A ligação de proteínas PII com o transportador de amônio AmtB foi demonstrada em

outros organismos como em *Corynebacterium glutamicum*, *R. rubrum*, *Bacillus subtilis*, *R. capsulatus* (BECKERS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; HEINRICH *et al.*, 2006, TREMBLAY *et al.*, 2007).

1.1.2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio é o processo que permite a utilização direta de dinitrogênio atmosférico para a incorporação deste elemento às biomoléculas. O dinitrogênio constitui cerca de 80% do ar atmosférico. Apesar desta abundância, somente alguns procariotos, denominados diazotrofos, são capazes de utilizá-lo diretamente (POSTGATE, 1987).

Azospirillum brasilense é capaz de fixar nitrogênio sob condições de microaerofilia e baixos níveis de nitrogênio (DÖBEREINER e DAY, 1976). Esse processo é catalisado pelo complexo da nitrogenase (EADY, 1986; POSTGATE, 1982).



O complexo da nitrogenase é composto por duas metaloproteínas: a dinitrogenase redutase (proteína Fe ou NifH), produto do gene *nifH*, e pela dinitrogenase, chamada proteína MoFe ou NifDK, produto dos genes *nifDK* (SCHRANK *et al.*, 1987; FANI *et al.*, 1989; DIXON e KAHN, 2004). A dinitrogenase redutase é um dímero γ_2 que possui um núcleo 4Fe-4S ancorado entre as subunidades γ . Este núcleo faz a transferência de elétrons de um doador até a proteína FeMo, com gasto de 2 ATP por elétron transferido. A proteína FeMo (ou NifDK) é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ que contém quatro centros metálicos: sendo 2 centros P (Fe₈-S₇) e 2 cofatores FeMo (MoFe₇S₉-homocitrato) (POSTGATE, 1987) (Figura 2, a). O mecanismo da redução de dinitrogênio pela nitrogenase foi elaborado baseado nos estudos da nitrogenase em *Klebsiella pneumoniae* e *A. vinelandii* (Figura 2, b). Após a ligação de duas moléculas de MgATP, NifH sofre uma mudança conformacional que altera o potencial de oxi-redução do núcleo [Fe₄S₄] e promove sua associação com a proteína NifDK (ASHBY e THORNELEY, 1987). A interação NifH-NifDK permite a transferência de um elétron de NifH para o cofator FeMo da proteína NifDK (LOWE *et al.*, 1993) e a hidrólise das duas moléculas de MgATP

ligadas a NifH, com liberação de fosfato inorgânico. A proteína NifH oxidada e ligada a MgADP se dissocia de NifDK. O ciclo reinicia com a redução de NifH por um doador de elétrons (uma ferredoxina ou flavodoxina) substituindo o MgADP por MgATP. O ciclo catalítico é repetido até que um número suficiente de elétrons seja transferido para que a proteína NifDK reduza seu substrato (HAGEMAN e BURRIS, 1978). A Figura 2 (a) mostra a estrutura do complexo NifH-NifDK da nitrogenase de *A. vinelandii*, e a Figura 2 (b) apresenta o ciclo catalítico da nitrogenase.

Devido à presença dos núcleos metálicos que funcionam como centros redox doadores de elétrons, as nitrogenases contendo ferro, molibdênio ou vanádio (no caso das nitrogenases alternativas presentes em *Azotobacter vinelandii* e *Rhodobacter capsulatus*) são extremamente sensíveis ao oxigênio (HOWARD e REES, 1996). O nível celular ótimo para que ocorra a fixação de nitrogênio está na faixa de 0,2 kPa de oxigênio dissolvido (revisado por HARTMANN e BALDANI, 2006). Uma mudança na concentração de oxigênio dissolvido em torno de 2 kPa é capaz de promover rápida inibição da atividade da nitrogenase, a qual é restaurada quando as condições de microaerofilia são restabelecidas (revisado por HARTMANN e BALDANI, 2006).

As nitrogenases apresentam baixa especificidade, podendo reduzir diversos compostos com dupla ou tripla ligação, como ácido cianídrico, ácido hidrazóico, óxido nitroso e acetileno. Essa capacidade é útil para a determinação de sua atividade (POSTGATE, 1987).

A atividade e expressão da nitrogenase são extremamente reguladas pelos níveis de oxigênio e de amônio intracelulares.

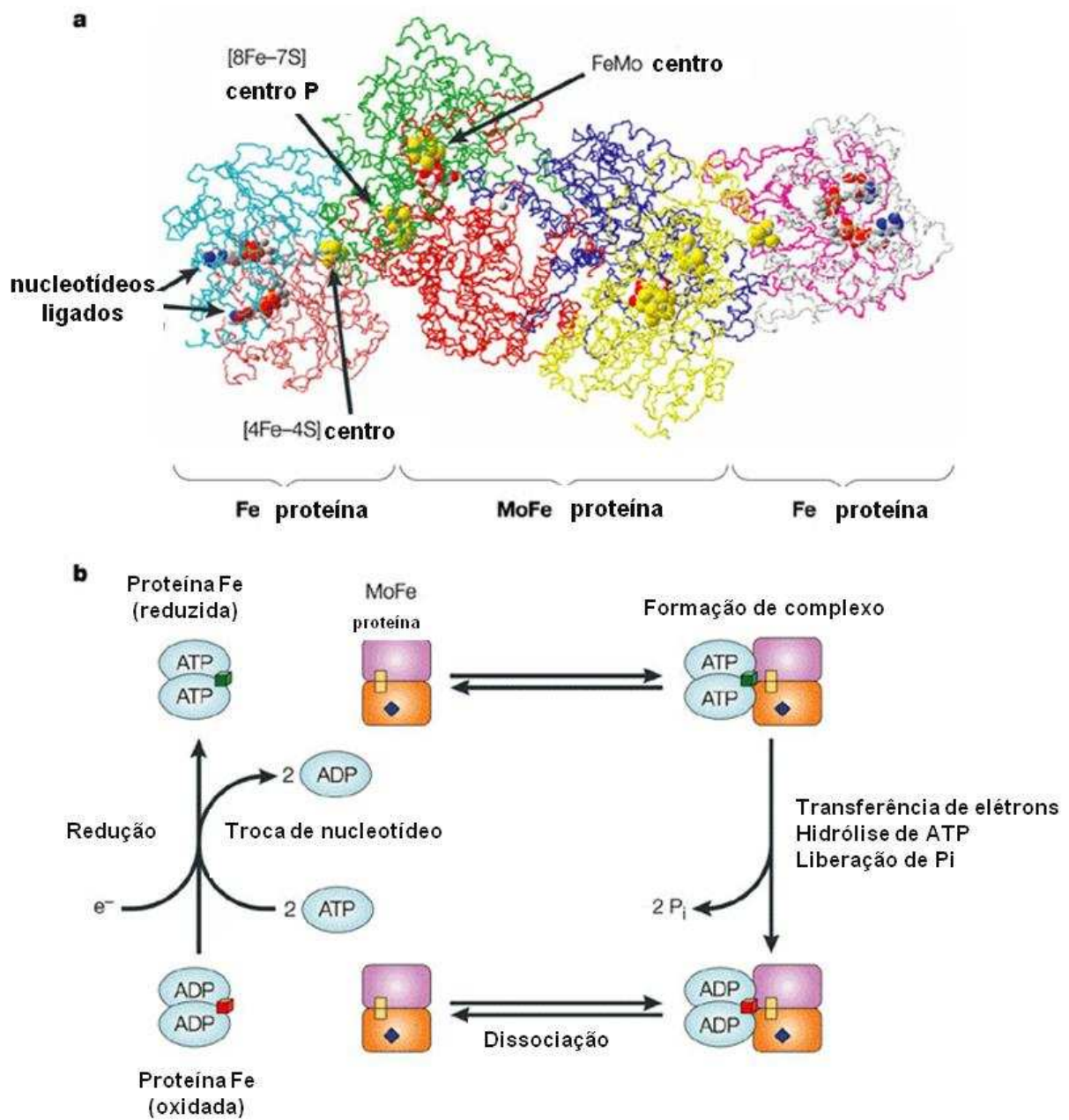
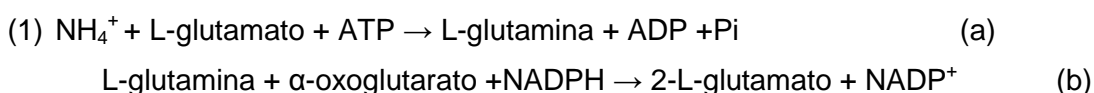


FIGURA 2. ESTRUTURA E CICLO CATALÍTICO DA NITROGENASE EM *A. brasilense*. Estrutura do complexo da nitrogenase de *A. vinelandii* contendo as proteínas Fe (NifH) e FeMo (NifDK) (a). Ciclo de associação/dissociação da proteína Fe à proteína FeMo com conseqüente redução de suas subunidades (b). A proteína Fe é apresentada em azul e FeMo em rosa e laranja. FONTE: adaptado de Dixon e Kahn (2004).

1.1.2.3 Assimilação de amônio

Dois caminhos são utilizados em bactérias para a assimilação do amônio captado, ou formado após redução do dinitrogênio atmosférico: via da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) (1) que ocorre em baixas concentrações de amônio e é a principal via de assimilação, e a via da glutamato desidrogenase (GDH) (2) que ocorre na presença de altos níveis de amônio (MERRICK e EDWARDS, 1995). A primeira via é aquela predominante em *A. brasilense* (OKON *et al.*, 1976). As reações catalisadas pelo sistema GS/GOGAT consistem de duas reações, sendo a primeira catalisada por GS (1,a) e a segunda (1,b) por GOGAT, enquanto que a reação catalisada por GDH é apresentada em (2) (WESTBY *et al.*, 1987).



A glutamato sintase é produto dos genes *gltDB*, enquanto que a glutamina sintetase é produto do gene *glnA* que faz parte do operon *glnBglmA* em *A. brasilense* (BOZOUKLIAN e ELMERICH, 1986; BOZOUKLIAN, FOGHER e ELMERICH, 1986; DE ZAMAROCZY, DELORME e ELMERICH, 1990).

A expressão de *glnA* de *A. brasilense* pode ocorrer a partir do seu próprio promotor, regulado por nitrogênio, ou pode ser expressa a partir dos dois promotores de *glnB*, dependentes de σ^{70} ou σ^{54} (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990 e 1993; HUERGO *et al.*, 2003). Em vários organismos, incluindo *E. coli*, a glutamina sintetase é uma enzima dodecamérica, com dois anéis hexagonais sobrepostos. Cada monômero apresenta massa molecular de 55kDa (YAMASHITA *et al.*, 1989). A atividade de GS pode ser controlada pós-traducionalmente de acordo com os níveis de nitrogênio fixado (SHAPIRO e STADTMAN, 1968). Em condições de excesso de nitrogênio, um grupamento adenilil é adicionado ao resíduo Tyr 397 dos monômeros de GS e sua atividade é inibida (SHAPIRO e STADTMAN, 1968). A inativação sequencial de cada

monômero permite um controle progressivo da atividade de GS, dependente das concentrações de amônio (SHAPIRO e STADTMAN, 1968). Em baixos níveis de nitrogênio ocorre remoção do grupamento AMP e a atividade de GS é restabelecida. A modificação da GS em *E. coli* é catalisada pela proteína ATase, ou GlnE, uma proteína monomérica de 115KDa, produto do gene *glnE* (STADMANN, 1990). Essa proteína apresenta uma atividade bifuncional transferásica/removedora de resíduos adenilil à GS, sendo que estas ocorrem em sítios catalíticos distintos (JAGGI *et al.*, 1997). A adição do grupamento adenilil envolve o gasto de ATP e a remoção deste grupamento envolve liberação de ADP (revisado por ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). Em *E. coli* as proteínas GlnB e GlnK atuam regulando a atividade de GS. Em baixos níveis de amônio GlnB-UMP interage com GlnE, promovendo a desadenililação de GS e sua ativação (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998c). Em altos níveis de amônio, portanto presença de glutamina, GlnB desuridilada estimula a atividade removedora de adenilil de GlnE, inativando GS (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998c). GlnK também é capaz de regular GS em *E. coli*, embora apresente menos eficiência quando comparada à GlnB, o que sugere que quando GlnB está presente *in vivo*, GlnK possa não exercer papel significativo na regulação da atividade de GS (ATKINSON e NINFA, 1999; VAN HEESWIJK *et al.*, 1996).

Em *A. brasilense* *glnA* parece ser essencial, uma vez que não foi possível a obtenção de formas viáveis de mutantes neste gene (BOUZOKLIAN e ELMERICH, 1986). Neste organismo, as proteínas PII parecem não exercer controle sobre a atividade de GS e o gene que codifica para a enzima GlnE foi recentemente encontrado (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990 e 1993, VAN DOMMELLEN *et al.*, 2009).

1.1.2.4 Sistema de regulação de nitrogênio (Ntr)

Na grande maioria das proteobactérias e nas enterobactérias, a expressão dos genes que controlam a assimilação e catabolismo do nitrogênio são reguladas por um sistema regulatório central, denominado, sistema Ntr. Participam desse sistema as proteínas GlnD, GlnB, GlnK (ou GlnZ), NtrB e NtrC (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

1.1.2.4.1 Regulação da atividade de NtrC

O modelo de regulação pelo sistema Ntr mais conhecido é o das enterobactérias (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). A ativação e a inibição da expressão dos genes dependentes do fator σ^{54} da RNA polimerase são reguladas pelo ativador transcricional NtrC (MORETT e SEGOVIA, 1993). Esta proteína faz parte de um sistema de dois componentes e sua atividade é regulada por fosforilação/defosforilação, catalisadas por NtrB. NtrC apresenta 3 domínios: o domínio C-terminal é o sítio de ligação ao DNA, um domínio central, relacionado com a ativação de transcrição por contato com σ^{54} , e um domínio N-terminal regulatório que apresenta um resíduo Asp-54 altamente conservado em proteínas pertencentes às do sistema de dois componentes (STOCK, NINFA e STOCK, 1989; PARKINSON e KOFOID, 1992). Esse resíduo sofre fosforilação/defosforilação por NtrB dependendo dos níveis de nitrogênio. Em altos níveis de nitrogênio a proteína NtrC encontra-se na forma dimérica e livre, estado mantido pela atividade fosfatase de NtrB. Em baixos níveis de nitrogênio ocorre a fosforilação e ativação de NtrC, catalisada por NtrB (KEENER e KUSTU, 1988; VOLKMAN *ET AL.*, 1995; WEISS *et al.*, 1988). A fosforilação de NtrC favorece a sua oligomerização, ligação ao DNA e ativação da transcrição de genes dependentes de NtrC (KEENER e KUSTU, 1988; WEISS *et al.*, 1992; WYMAN *et al.*, 1997). Muitos promotores dependentes desta proteína apresentam múltiplos sítios de ligação de NtrC para facilitar sua oligomerização, que é essencial para a ativação de transcrição dos genes dependentes de σ^{54} (WYMAN *et al.*, 1997).

A proteína NtrB apresenta 3 domínios: um domínio N-terminal de transdução de sinal, um domínio central de dimerização, e um domínio C-terminal com atividade de quinase (NINFA, 1996; PARKINSON e KOFOID, 1992). O controle das atividades de NtrB é feito pela proteína GlnB (PIOSZAK, JIANG e NINFA, 2000). Na presença de GlnB e ATP, ou seja, em altos níveis de amônio, a atividade de fosfatase de NtrB é ativada levando à remoção do grupamento fosfato de NtrC, inativando-a. Em baixos níveis de amônio GlnB-UMP não é capaz de interagir com NtrB que fosforila NtrC, ativando-a (revisado por ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). A proteína NtrC fosforilada ativa a transcrição de genes envolvidos na assimilação de fontes

alternativas de nitrogênio (revisado por ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). O modelo desta regulação é apresentado na Figura 3.

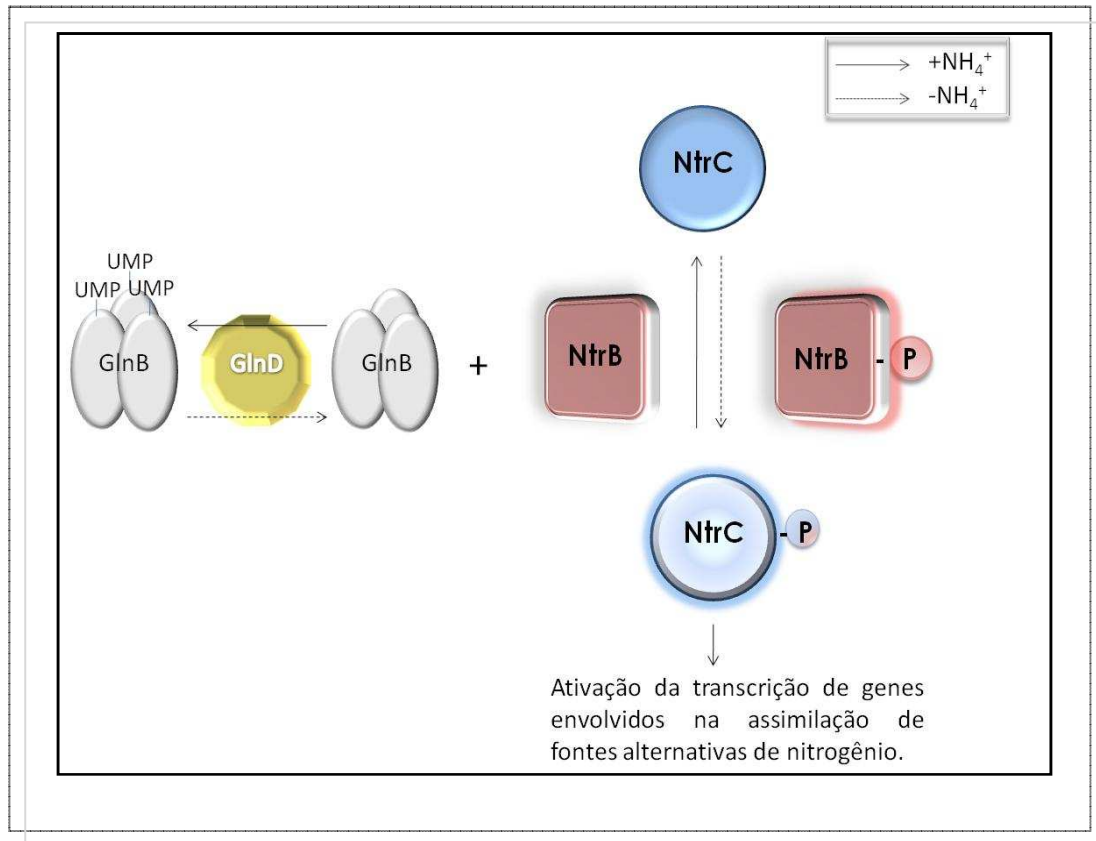


FIGURA 3. REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE NtrC EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE NITROGÊNIO. Em baixos níveis de nitrogênio a proteína GlnD promove a uridililação de GlnB. Nesta forma, GlnB-UMP é incapaz de interagir com NtrB, que assume sua atividade de quinase, fosforilando e ativando NtrC. De maneira reversa, em altos níveis de nitrogênio a proteína GlnB é desuridililada por GlnD e dessa forma é capaz de interagir com NtrB, ativando sua atividade de fosfatase que remove um grupamento fosfato de NtrC, inativando-a (revisado por ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). FONTE: A autora (2009).

Outro par de proteínas regulatórias envolvidas com o metabolismo de nitrogênio e também pertencentes à família de sistema de dois componentes foi encontrado em *A. brasilense*: as proteínas NtrX/NtrY (MACHADO *et al.*, 1995; ISHIDA *et al.*, 2002). A proteína NtrX assemelha-se a NtrC, enquanto que NtrY assemelha-se à NtrB. Em *A. brasilense* os genes que codificam proteínas NtrXY estão localizados a jusante do operon que contém os genes *ntrBC* e não foi possível a obtenção de mutantes insercionais em *ntrXY*, o que sugere que eles são essenciais para a viabilidade celular neste organismo (VITORINO *et al.*, 2001;

ISHIDA *et al.*, 2002). Essas proteínas foram capazes de substituir NtrB/NtrC na ativação da expressão de proteínas envolvidas na utilização de nitrato, mostrando que em algumas situações, NtrXY pode substituir NtrBC, mas sua participação no sistema regulatório de nitrogênio em *A. brasilense* ainda não foi esclarecida. Em *Azorhizobium caulinodans*, os genes *ntrXY* foram isolados e são co-transcritos a partir de um promotor dependente de NtrC (PAWLOWSKI *et al.*, 1991). Neste organismo um mutante *ntrC* ou *ntrX* foram incapazes de ativar a expressão de *nifA*. Os resultados indicam que, em *A. caulinodans*, as proteínas do sistema NtrX/NtrY participam do metabolismo de nitrogênio (PAWLOWSKI *et al.*, 1991).

1.1.2.4.2 Regulação transcricional dos genes *nif*

Em todas as bactérias Gram negativas fixadoras de nitrogênio, como *A. brasilense*, a expressão dos genes *nif*, responsáveis pela síntese da nitrogenase, é dependente do fator σ^{54} da RNA polimerase e da proteína NifA, produto do gene *nifA* (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Nestes organismos, os genes *nif* apresentam promotores do tipo -24/-12, reconhecidos pelo fator σ^{54} e, a montante destes, apresentam sequências ativadoras (UAS), que são sítios de ligação da proteína ativadora de transcrição NifA. Assim como NtrC, NifA apresenta 3 domínios característicos de proteínas ativadoras de transcrição dependentes de σ^{54} : um domínio do tipo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA; um domínio central de ligação do fator σ^{54} e ATP, e uma porção amino-terminal, menos conservada, que controla a atividade da proteína. Após a ligação da proteína NifA às regiões UAS, ocorre sua interação com a RNA polimerase e a hidrólise do ATP, favorecendo a formação do complexo aberto e início da transcrição (DIXON e KAHN, 2004).

A expressão e atividade de NifA são reguladas tanto em resposta aos níveis de nitrogênio, quanto à concentração de oxigênio intracelular. Em diversos organismos, como *Klebsiella pneumoniae*, *H. seropedicae* e *Rhodobacter capsulatus*, a expressão de *nifA* é dependente de NtrC (HOLTEL e MERRICK, 1989; MONTEIRO *et al.*, 1999; FOSTER-HARNTNETT e KRANZ, 1992). Em *A. brasilense*, entretanto, a expressão de *nifA* é independente de NtrC e o amônio e oxigênio atuam sinergicamente inibindo sua expressão (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999).

A deleção do domínio N-terminal de NifA em *A. brasilense* e *H. seropedicae* mostrou que ele não é fundamental para a sua atividade, mas que exerce papel

regulatório (ARSENE *et al.*, 1996; MONTEIRO *et al.*, 1999). Um mutante *glnB⁻* de *A. brasilense* foi incapaz de fixar nitrogênio, sugerindo o envolvimento desta proteína no controle de atividade de NifA. Além disso, o fenótipo Nif⁻ de um mutante *glnD⁻*, incapaz de promover a uridililação de GlnB em baixos níveis de amônio, sugeriu que GlnB-UMP é necessário para o controle de NifA (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). Um mecanismo de regulação da atividade de NifA por GlnB foi proposto por Arsene e colaboradores (1996). Neste modelo, NifA encontraria-se inativa na presença de íons amônio, tendo o seu domínio N-terminal interagindo e inativando os domínios central e C-terminal. Na ausência de íons amônio, a proteína GlnB interagiria com a porção N-terminal impedindo a interação deste domínio sobre as porções central e C-terminal, permitindo sua ligação ao DNA e ativação da transcrição (ARSENE *et al.*, 1996). Um esquema mostrando a cascata regulatória do sistema Ntr em *A. brasilense* é apresentado na Figura 4.

O controle da atividade de NifA por oxigênio parece ocorrer devido à presença de 4 resíduos de cisteína conservados nas proteínas NifA de *A. brasilense* assim como em outras proteobacterias diazotróficas, como *H. seropedicae* e *Bradyrhizobium japonicum* (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; DIXON e KAHN, 2004).

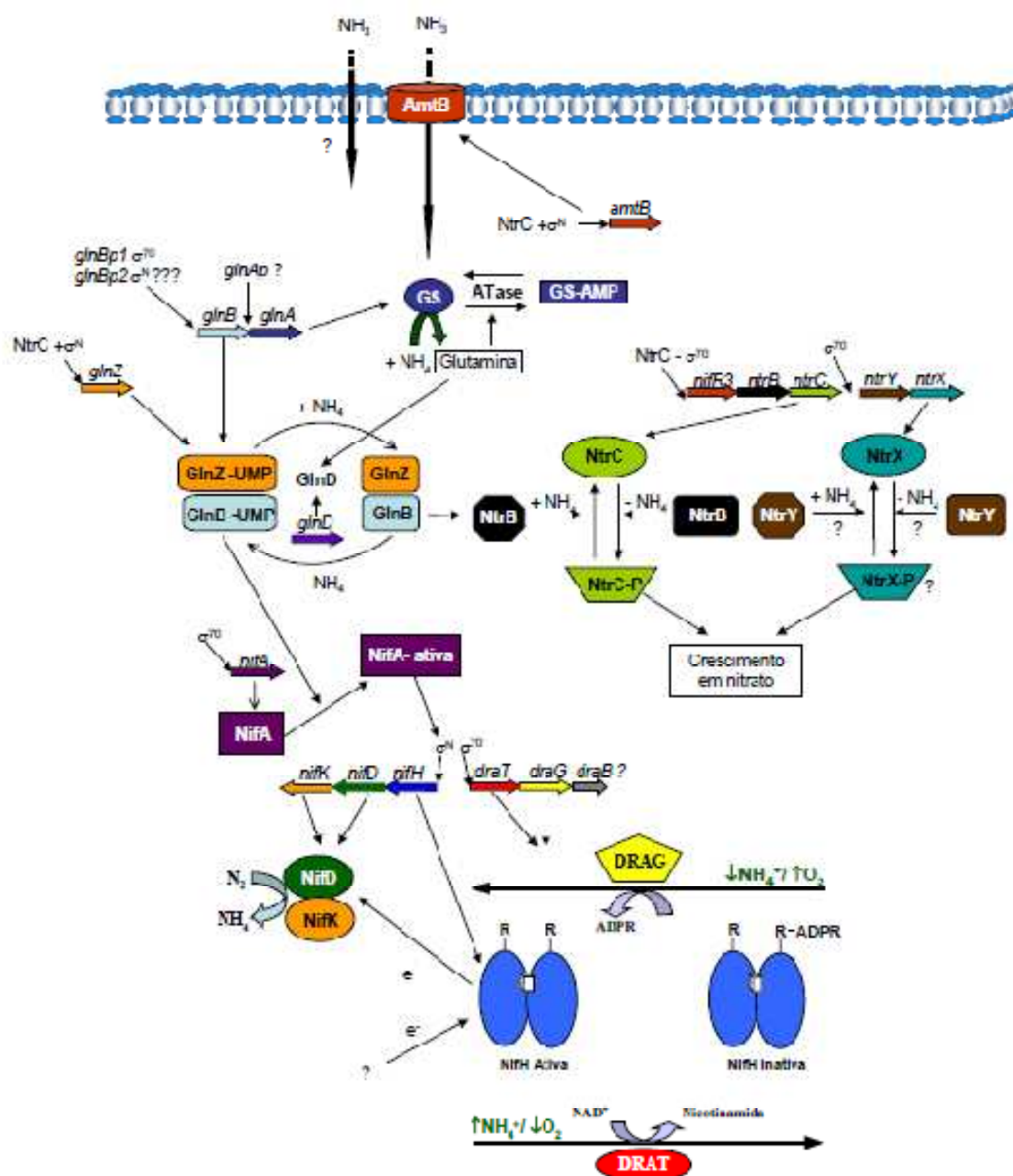


FIGURA 4. SISTEMA Ntr DE *A. brasilense*. Organização estrutural dos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio. As vias de captação de amônio (via transportadores de membrana), assimilação de amônio (via GS), sensoriamento dos níveis intracelulares de nitrogênio (sistema PII/GlnD), vias ativadoras de transcrição de genes envolvidos na assimilação de nitrogênio (sistema NtrBC e ativação de NifA), além do controle da atividade da nitrogenase (via DraT/DraG) são apresentados. Os pontos de interrogação indicam dados não experimentais que possivelmente se assemelham àqueles obtidos para outros organismos, cujas vias já foram descritas. FONTE: Huergo (2006).

1.1.2.4.3 Regulação pós-traducional da atividade de nitrogenase

Além da regulação transcricional dos genes *nif* em *A. brasilense* o aumento da concentração de íons amônio causa a rápida inativação da atividade da nitrogenase em decorrência da ADP-ribosilação de NifH (ZHANG *et al.*, 1993). Após consumo dos íons amônio, a atividade da enzima é restaurada pela remoção de um grupamento ADP-ribosil (ZHANG *et al.*, 1993). Esse fenômeno de desligamento e religamento da nitrogenase é uma resposta rápida às variações intracelulares de amônio e foi descrito em diversos organismos além de *A. brasilense*, como em *R. rubrum* (LOWERY *et al.*, 1986), *R. capsulatus* (MASEPOHL, KREY e KLIPP, 1993), *A. lipoferum* (ZHANG *et al.*, 1997) e *Azotobacter chroococcum* (MUNOZ- CENTENO *et al.*, 1996). O grupamento ADP-ribosil é ligado ao resíduo Arg101 de uma das subunidades de NifH (proteína Fe) (SCHINDELIN *et al.*, 1997). Na forma modificada, esta proteína é incapaz de interagir com NifDK (proteína FeMo), impedindo a transferência de elétrons e redução do substrato (SCHINDELIN *et al.*, 1997). Esse processo é catalisado pela proteína dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT, produto do gene *draT*), enquanto que a reativação da nitrogenase é catalisada pela dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG, produto do gene *draG*) (revisado por HALBLEID e LUDDEN, 2000). Os genes *draT* e *draG* de *A. brasilense* estão localizados a montante dos genes *nifHDK* e são constitutivamente expressos (FU *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 1993).

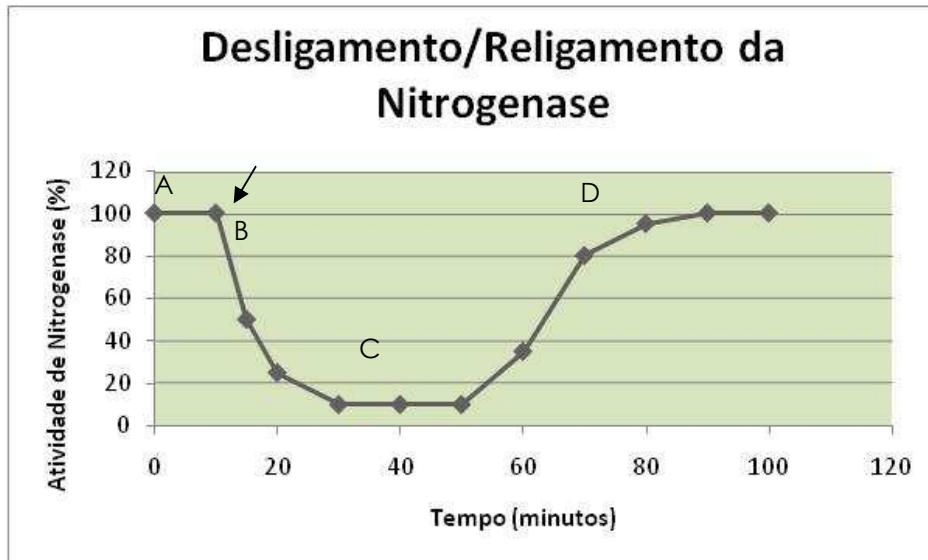
A nitrogenase também sofre modificação pós-traducional em resposta à limitação de energia, anaerobiose, ou queda de luminosidade nos organismos fotossintetizantes, como *R. rubrum* (HARTMANN *et al.*, 1986; LOWERY *et al.*, 1986; MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002). Todos esses mecanismos parecem envolver a modificação covalente mediada pelo sistema DraT/DraG (ZHANG *et al.*, 1993; MERRICK e EDWARDS, 1995). Em *A. brasilense*, a mutagênese do resíduo Arg101 da proteína Fe sugeriu a presença de um segundo mecanismo de controle pós-traducional da nitrogenase, uma vez que esse mutante ainda foi capaz de sofrer desligamento parcial desta enzima após adição de íons amônio (ZHANG *et al.*, 1996). Esse efeito também foi observado em um mutante *drat*⁻ de *A. brasilense* que foi incapaz de promover a modificação covalente da nitrogenase em resposta à adição de íons amônio (ZHANG *et al.*, 1996).

O modelo de regulação da atividade de DraT e DraG foi proposto por ZHANG e colaboradores (1997) e sugere que DraT encontra-se inativa em condições favoráveis à fixação de nitrogênio, enquanto que DraG encontra-se ativa. Nestas condições NifH (proteína Fe) encontra-se não modificada e ativa (ZHANG *et al.*, 1997). Quando um estímulo negativo é adicionado (adição de íons amônio, anaerobiose ou mudança de luminosidade) DraT é imediatamente ativada, enquanto que DraG torna-se inativa, levando à modificação covalente de NifH e sua inativação. Após remoção do estímulo negativo, DraT torna-se inativa e DraG é reativada, levando à remoção do grupamento ADP-ribosil e reativação da nitrogenase (ZHANG *et al.*, 1997). A Figura 5 mostra o perfil da inativação/reativação da nitrogenase em resposta a um estímulo negativo. Em condições favoráveis à fixação de nitrogênio, onde NifH encontra-se não modificada, a atividade de nitrogenase é de 100% (Figura 5,A). Após a adição do estímulo negativo, NifH é rapidamente inativada, levando à queda da atividade (B,C). Durante a presença deste estímulo, NifH encontra-se inativa (C). Após consumo ou remoção do estímulo negativo, DraT é inativada, DraG ativada e o grupamento ADP-ribosil removido de NifH, restaurando sua atividade (D).

Klassen e colaboradores (2001) sugeriram que em *A. brasilense* as proteínas PII participam do controle pós-traducional da nitrogenase. Um mutante *glnZ* de *A. brasilense* estirpe 7611 apresentou deficiência no religamento da nitrogenase após consumo dos íons amônio, sugerindo que GlnZ poderia atuar controlando a atividade de DraG (KLASSEN *et al.*, 2001). Posteriormente, foi mostrado que um mutante *glnB* de *A. brasilense* apresentava deficiência de desligamento da nitrogenase, o que sugeriu que GlnB participasse da regulação da atividade de DraT (Klassen *et al.*, 2005). Huergo e colaboradores (2006) mostraram, então, que as proteínas GlnB e GlnZ atuam interagindo diretamente com as proteínas DraT e DraG, respectivamente (HUERGO *et al.*, 2006), e que, além do estado de uridililação das proteínas PII, a formação do complexo DraG-GlnZ e DraT-GlnB dependem dos níveis intracelulares de carbono e energia: 2-oxoglutarato, ATP e ADP (HUERGO *et al.*, 2009). A interação DraT-GlnB é dependente do estado de uridililação de GlnB, enquanto que a formação com complexo DraG-GlnZ independe da modificação covalente de GlnZ, sugerindo que a interação DraT-GlnB ocorra via alça T, enquanto que a interação DraG-GlnZ ocorra em outro sítio de GlnZ (HUERGO *et al.*, 2009).

Ambos os complexos são mais estáveis na presença de ADP, baixo 2-oxoglutarato e quando as proteínas PII estão desuridiladas (HUERGO *et al.*, 2009).

I)



II)

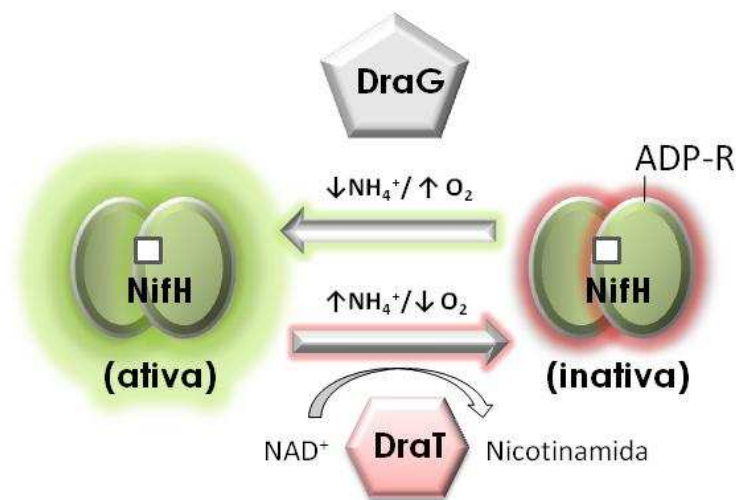


FIGURA 5. REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA ATIVIDADE DA NITROGENASE. Inativação/reativação da nitrogenase em função do tempo. O estímulo negativo é adicionado em A (indicado por uma seta) quando a atividade da nitrogenase cai próximo a zero (B e C). Durante permanência do estímulo negativo, a nitrogenase encontra-se inativa (C). Após consumo ou remoção do estímulo a atividade de nitrogenase é restaurada (D). II) Modelo regulação pós-traducional da nitrogenase, catalisada por DraT/DraG. Em altos níveis de amônio ou anaerobiose, DraT é ativada e inativa, por modificação covalente, NifH. Em baixos níveis de amônio ou presença de microaerofilia, DraT é inativada, DraG ativada e NifH reativada. FONTE: adaptado de Nordlund (2000).

A demonstração de que após o choque de amônio em *A. brasilense* ocorre um sequestro de GlnZ e DraG dependente de AmtB e que esse complexo é desfeito após consumo dos íons amônio e responde às concentrações de carbono e níveis de energia, permitiram propor um modelo de regulação da atividade da nitrogenase em *A. brasilense* (Figura 6, HUERGO *et al.*, 2009). Em condições de fixação de nitrogênio, os níveis intracelulares de glutamina são baixos e os de 2-oxoglutarato altos (Figura 6). Nessas condições, GlnB e GlnZ encontram-se uridililadas, localizadas no citoplasma e possivelmente ligadas ao ATP e 2-oxoglutarato. DraT encontra-se inativa e DraG, presente no citoplasma, encontra-se ativa. A proteína Fe encontra-se não modificada, permanecendo ativa e, portanto, a relação ATP/ADP é alta. Nestas condições as proteínas do tipo PII apresentam fraca interação com as proteínas DraT e DraG. Após o choque de amônio, ocorre diminuição da concentração de 2-oxoglutarato e um aumento da concentração de glutamina que, conseqüentemente, leva à desuridililação das proteínas PII, catalisada por GlnD. A relação ATP/ADP diminui devido, provavelmente, ao fluxo de amônio catalisado pela enzima GS (glutamina sintetase). O aumento da concentração de ADP e sua ligação às proteínas PII favorece as formações dos complexos DraT-GlnB, DraG-GlnZ e AmtB-GlnZ-DraG. Nestas condições, DraT encontra-se na forma ativa e promove a adição do grupamento ADP-ribosil à NifH, inativando-a.

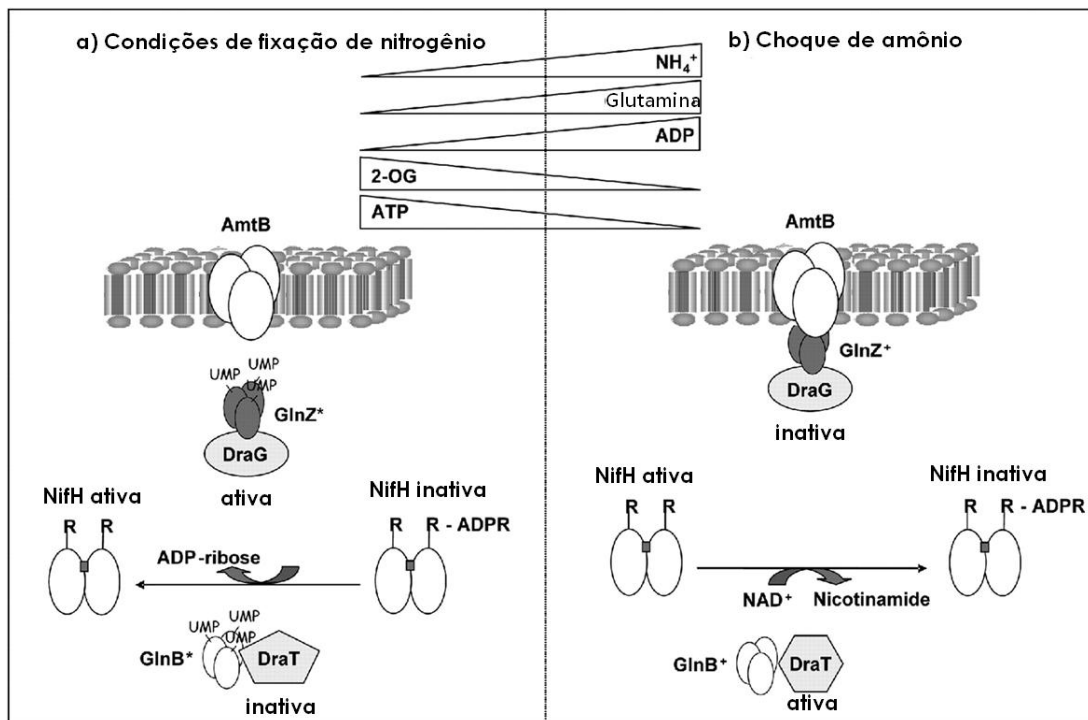


FIGURA 6. MODELO DE REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA NITROGENASE EM *A. brasilense*. Após o choque de amônio as concentrações de 2-oxoglutarato (2-OG) e ATP diminuem, enquanto que as concentrações de ADP e glutamina aumentam. Nestas condições, ocorre o sequestro das proteínas GlnZ/DraG por AmtB e ativação de DraT por contato com GlnB, e NifH é inativada por ADP-ribosilação. Em condições de fixação de nitrogênio, quando as concentrações de glutamina e ADP encontram-se baixas e as de ATP e 2-oxoglutarato altas, as proteínas PII são uridililadas e encontram-se no citoplasma. DraT inativa e DraG ativa, removendo o grupamento ADP-ribosil e reativando a nitrogenase. FONTE: adaptado de Huergo *et al.* (2009).

2. JUSTIFICATIVA

A proteína GlnB apresenta papel central no controle do sistema regulatório de nitrogênio. Apesar da alta identidade na sequência primária das proteínas GlnB e GlnZ, uma é incapaz de substituir a outra, sendo que resíduos específicos devem ser determinantes para a especificidade funcional destas proteínas. Estudos com mutantes *glnB* em diversos organismos vem colaborando para a caracterização da função de seu produto. Recentemente foi demonstrado que formas variantes de GlnB de *R. rubrum* apresentavam alterações de interação com proteínas alvo em resposta às variações intracelulares de nitrogênio, sugerindo que alguns resíduos de PII são essenciais para sua atividade. Da mesma forma, proteínas mutantes GlnBL13P e GlnBV100A derivadas da proteína GlnB de *A. brasilense* não foram capazes de complementar o fenótipo Nif⁻ de uma estirpe mutante *glnB⁻* de *A. brasilense*, sugerindo que estas formas mutantes são incapazes de ativar a proteína NifA (INABA, 2005). Os resultados sugeriram que estes resíduos são essenciais para a atividade de GlnB. Um dos resíduos sabidamente importante para a atividade de GlnB é o resíduo tirosina 51, alvo de uridililação em resposta à variação intracelular dos níveis de nitrogênio. Estudos com mutantes *glnD⁻*, incapazes de uridililar proteínas do tipo PII, sugeriram que a forma uridililada de GlnB é a responsável pela ativação de NifA (VAN DOMMELENN *et al.*, 2002). Neste trabalho foi obtido um gene mutante *glnBY51F* de *A. brasilense*, que foi incapaz de complementar o fenótipo Nif negativo do mutante *glnB*. Paralelamente, as proteínas GlnB selvagem e mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F foram purificadas e caracterizadas em ensaios de uridililação e de ligação de efetores para verificar a importância destes resíduos na atividade de GlnB. Um melhor entendimento da função destes resíduos deverá contribuir para a compreensão da sinalização dos níveis de amônio, carbono e energia por GlnB em *A. brasilense*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar o efeito da mutagênese de resíduos de aminoácidos da proteína GlnB de *A. brasilense* sobre sua atividade.

3.2. Objetivos específicos

- Construir um mutante *glnBY51F* de *A. brasilense*
- Determinar o efeito da mutação GlnBY51F na ativação de NifA em *A. brasilense*
- Determinar a formação de heterotrímeros entre proteínas PII não modificadas e uridililadas
- Purificar as proteínas GlnB selvagem e mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F.
- Construir o modelo estrutural teórico das proteínas GlnB selvagem e mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F.
- Determinar o perfil de uridililação das proteínas GlnB mutantes pela proteína GlnD de *A. brasilense*.
- Determinar as constantes de dissociação de 2-oxoglutarato, ATP, ADP e AMP da proteína GlnB de *A. brasilense* por microcalorimetria
- Determinar ligação de 2-oxoglutarato e ATP das proteínas mutantes GlnBY51F e GlnBV100A de *A. brasilense*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bactérias

As estirpes de *A. brasilense* utilizadas foram: FP2 (estirpe selvagem, Sp7 Nif⁺ Nal^r Sm^r), 2812 (mutante *glnB*⁻ *glnZ*⁻; de ZAMAROCZY, 1996) e LFH3 (mutante *glnB*; HUERGO *et al.*, 2006).

As estirpes de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho foram S17.1 (RP4-2 Tc^r::Mu Km^r::Tn7 Tra *recA*; SIMON *et al.*, 1983), DH10B (Sm^r, F' [*proAB*⁺ *lacZ*ΔM15]; SAMBROOK *et al.*, 1989) e BL21 (λDE3) *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ(DE3) (STRATAGENE).

4.2 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1- LISTA DE PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Propriedade	Referência
pTZ18R	Amp ^r , vetor multifuncional de clonagem e sequenciamento, <i>plac</i> .	MEAD <i>et al.</i> , 1986
pTZ19R	Amp ^r , vetor multifuncional de clonagem e sequenciamento, <i>plac</i> .	MEAD <i>et al.</i> , 1986
pUC18	Amp ^r , vetor multifuncional de clonagem e sequenciamento, <i>plac</i>	INVITROGEN
pLAFR3.18	Tc ^r , derivado do vetor pLAFR3, contendo o sítio de policlonagem do vetor pTZ18R	MACHADO <i>et al.</i> , 1995.
pET29a(+)	Km ^r , vetor de expressão, promotor T7	NOVAGEN
pJI8	Amp ^r , <i>glnB</i> -His de <i>A. brasilense</i> em pTZ18R <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III, <i>plac</i>	INABA, 2005
pJI6	Amp ^r , <i>glnBL13-P</i> -His de <i>A. brasilense</i> em pTZ18R <i>Kpn</i> I/ <i>Hind</i> III, <i>plac</i>	INABA, 2005
pJI9	Amp ^r , <i>glnBV100-A</i> -His de <i>A. brasilense</i> em pTZ18R <i>Kpn</i> I/ <i>Hind</i> III, <i>plac</i>	INABA, 2005
pJIB51	Amp ^r , <i>glnBY51F</i> -His de <i>A. brasilense</i> em pUC18 <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I, <i>plac</i>	Este trabalho
pJI52	Amp ^r , <i>glnBY51F</i> -His de <i>A. brasilense</i> em pUC19 <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I, <i>plac</i>	Este trabalho
pLH25	Km ^r , <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> em pET29a(+) <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI, promotor T7.	HUERGO, 2006
pJI8.2	Tc ^r , <i>glnB</i> -His de <i>A. brasilense</i> em pLAFR3.18 <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III, <i>plac</i>	Este trabalho
pJI3.51	Tc ^r , <i>glnBY51F</i> -His de <i>A. brasilense</i> em pLAFR3.18 <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III, <i>plac</i>	Este trabalho
pJI2.6	Km ^r , <i>glnBL13-P</i> de <i>A. brasilense</i> em pET29a(+) <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI, promotor T7	Este trabalho
pJI2.9	Km ^r <i>glnBV100-A</i> de <i>A. brasilense</i> em pET29a(+) <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI, promotor T7	Este trabalho
pJIB53	Km ^r <i>glnBY51-F</i> de <i>A. brasilense</i> em pET29a(+) <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI, promotor T7	Este trabalho

4.3 Meios de Cultura e Condições de Cultivo

As estirpes de *Azospirillum brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHP lactato (MACHADO *et al.*, 1991). A fonte de nitrogênio foi NH₄Cl (20 mmol/l) ou glutamato (5 mmol/L) (MACHADO *et al.*, 1991). As soluções de fosfato e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento de uso. O pH do meio de cultura foi de 6,8.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB, SOB ou SOC (SAMBROOK *et al.*, 1989), sob agitação constante de 130 rpm à 37°C.

As composições dos meios de cultura utilizados são apresentadas abaixo:

MEIO LB (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Componentes	g/L
Triptona	10
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10

O pH foi ajustado para 7,5 com uma solução de NaOH 2 mol/L. Para obtenção do meio sólido ágar na concentração de 15 g/L foi adicionado ao meio líquido. O meio sólido foi denominado LA.

MEIO SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Componentes	g/L
Triptona	20
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	0,584
Cloreto de potássio	0,186

Para obtenção do meio SOC foram acrescidos 3,6 g/L glucose, 0,94 g/L MgCl₂ e 1,2 g/L MgSO₄ ao meio SOB. O pH dos meios de cultura foram corrigidos para pH 7,0 com uma solução de NaOH 2 mol/L.

MEIO NFbHP (MACHADO et al., 1991)

Componentes	g/L
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

As soluções de fosfato e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso. Para preparo do meio NFbHP sólido foi adicionado ao meio 15 g/L de ágar bacteriológico ao meio líquido.

Estoques das culturas de *E. coli* e *A. brasilense* foram mantidos em suspensão de glicerol 50% à -20°C .

4.4 Antibióticos

Os antibióticos utilizados foram preparados conforme SAMBROOK *et al.* (1989) e os estoques mantidos a -20°C . As concentrações de preparo, bem como as utilizadas para cada microrganismo estão apresentadas na tabela 2.

TABELA 2 – ANTIBIÓTICOS

Antibióticos	Abreviatura	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina	Amp	250	250
Canamicina	Km	100	50 ^a , 100 ^b
Estreptomicina	Sm	80	80 ^{a,b}
Cloranfenicol	Cm	30	30 ^a
Tetraciclina	Tc	10	10 ^{a,b}
Ácido Nalidíxico	Nal	10	5 ^b

a: *E. coli*; b: *A. brasilense*

As soluções de antibióticos foram preparadas em água MiliQ autoclavada, e foram esterilizadas por filtração em filtro Millipore HAWP 0,22 µm. A solução estoque de tetraciclina foi preparada com etanol 50% e estocada sob abrigo da luz. A solução de ácido nalidíxico foi preparada em uma solução de NaOH 0,2 mol/L.

4.5 Reagentes

Glicerol, *o*-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo (ONPG), Tris base, SDS, persulfato de amônio, TEMED e os antibióticos foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Os géis de poliacrilamida foram preparados usando uma solução de acrilamida 40% (relação acrilamida:bis-acrilamida 29:1) da Amresco. Extrato de levedura, triptona e ágar bacteriológico foram adquiridos da Merck, Oxoid. Agar e agarose foram adquiridos da Invitrogen (Life-Technologies). EDTA, NaCl, NaOH, etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, clorofórmio e álcool isoamílico foram adquiridos da Merck. As enzimas modificadoras de DNA e RNase foram adquiridas da G. E. Health Care, Invitrogen, Fermentas ou New England Biolabs. Os gases nitrogênio, hidrogênio, acetileno, ar comprimido e etileno padrão (100 ppm) foram adquiridos de White Martins S.A. Os demais reagentes utilizados foram obtidos de diversos fornecedores, sendo eles todos para biologia molecular.

4.6 Técnicas de Biologia Molecular

As reações de purificação de DNA total e plasmidial, digestão com endonucleases de restrição, reação de ligação, eletroforese em gel de agarose, transformação bacteriana, preparo da solução de RNase, preparo das soluções de fenol, clorofórmio:álcool isoamílico e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram feitas conforme SAMBROOK *et al.* (1989) ou conforme recomendação do fabricante.

4.7 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxirribonucleotídeos marcados com fluorescência, como terminadores de cadeia (SANGER *et al.*, 1977). Uma mistura de reação continha cerca de 200 a 500 ng de DNA dupla fita, 1 pmol dos oligonucleotídeos que anelam às sequências dos vetores (reverso e universal para o vetor pTZ18R, pUC18 e pLAFR3.18 ou T7 para o vetor pET29a(+)) e 4 µL de mistura para sequenciamento ET mix (GE Healthcare). Os fragmentos foram amplificados utilizando um ciclo de 96°C durante 20 segundos, seguido de 30 ciclos a 60°C, durante 1,5 minuto. O produto da reação foi precipitado utilizando 6,7 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 68 µL de etanol absoluto. O precipitado lavado com 450 µL de etanol 70% e seco a vácuo. A mostra foi desnaturada por 2 minutos a uma temperatura de 96°C e submetida à eletroforese em sequenciador automático ABI377 (Applied Biosystems).

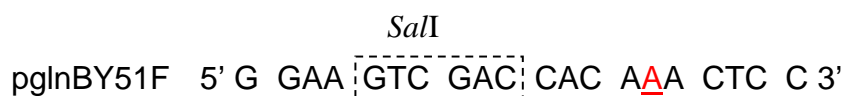
4.8 Determinação da Concentração de Proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o método de Bradford *et al.* (1976). Albumina bovina foi utilizada como padrão.

4.9 Mutagênese sítio dirigida do gene *glnB* de *A. brasilense*

Para a obtenção de um mutante *glnB* contendo a substituição tirosina 51 por fenilalanina (GlnBY51F) foram construídos oligonucleotídeos específicos que anelam no gene *glnB*, sobrepondo-se em aproximadamente 20 pares de base a região alvo

de mutação. Nessa região foi modificado o códon de tradução do resíduo tirosina 51 (Y51) para fenilalanina (F51). O oligonucleotídeo construído apresenta a sequência:



A adenina que substituiu a timina presente nesta posição é apresentada em sublinhado.

O plasmídeo pJl8 que contém o gene *glnB* de *A. brasilense* fusionado a uma cauda de histidina (0,5-1,0 µg) foi utilizado como molde em um sistema de reação (25 µL) contendo tampão de PCR (10 mmol/L Tris-HCl pH 8,3, 50 mmol/L de KCl), 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de dNTP, 10 pmol de *primer* reverso e mutagênico e 1,5 U de Taq DNA polimerase. A reação de amplificação consistiu de um ciclo a 95° C- 5min, seguido de 30 ciclos a 94°C- 30 seg, 57°C- 30 seg e 72°C- 2:30 min e um ciclo de 72°C- 10 min. O produto dessa reação foi digerido com as enzimas *KpnI/SalI* (Figura 7, B).

Uma segunda reação de amplificação foi realizada utilizando como molde o plasmídeo pJl8, em um sistema idêntico ao anterior, utilizando 10 pmol de *primer* universal e 10 pmol *primer* reverso, os quais flanqueiam o inserto do vetor pTZ18R, para a amplificação o gene *glnB* de *A. brasilense*. O produto desta reação foi digerido com as enzimas *SalI/SacI* (Figura 7, A). Ao vetor pUC18 digerido com *KpnI/SacI* foram ligados o produto da primeira reação de amplificação digerido com *KpnI/SalI* e o fragmento *SalI/SacI* do produto de amplificação da segunda reação. O produto desta ligação foi transformado em *E. coli* DH10B e os clones obtidos foram sequenciados para confirmar a presença da mutação. Foi obtido um clone contendo a alteração de interesse que passou a se chamar pJlB51. A Figura 7 apresenta um esquema da estratégia utilizada para obtenção deste clone.

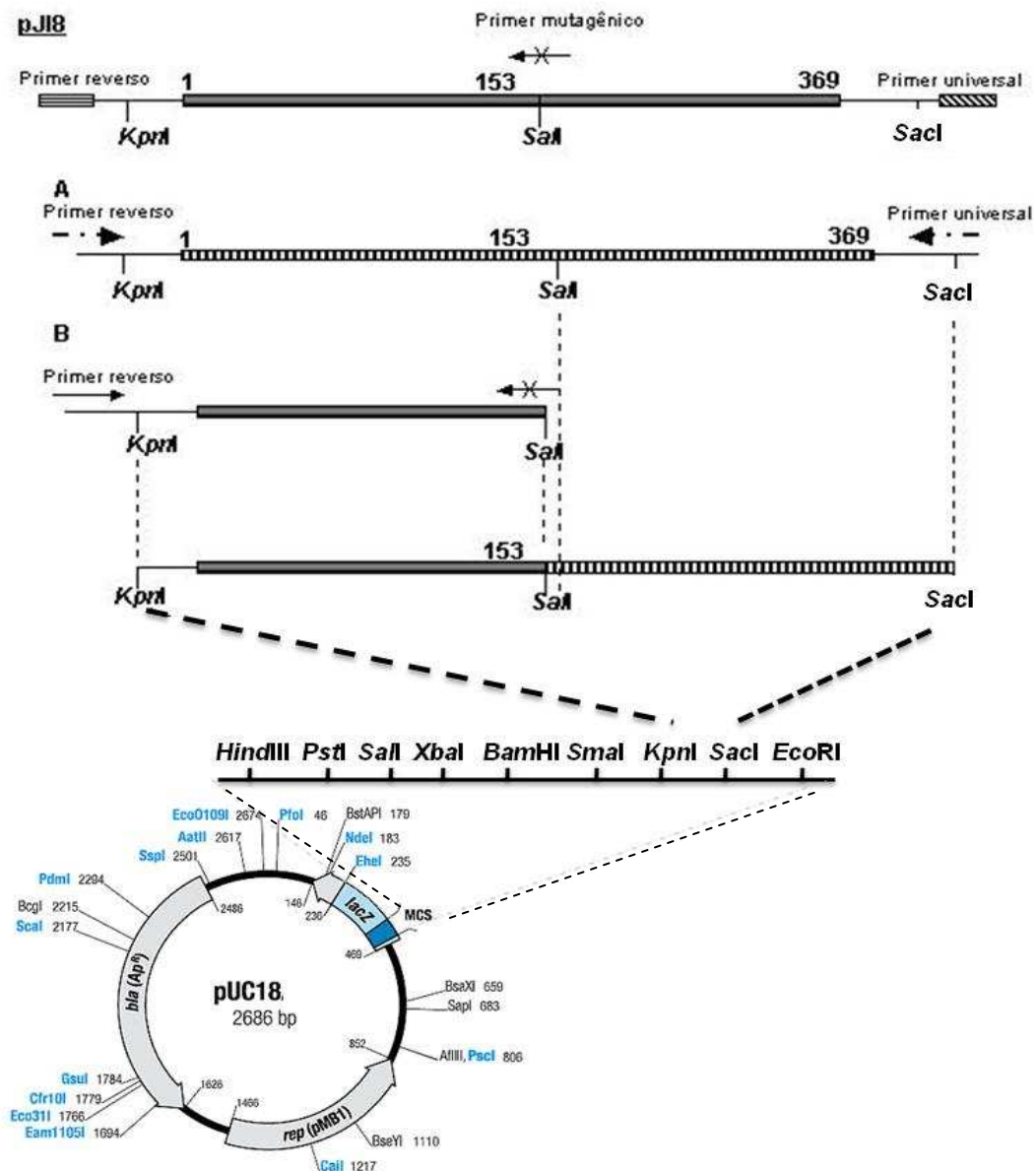


FIGURA 7: ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DO MUTANTE *glnBY51F* DE *A. brasilense*. O plasmídeo pJ18 foi utilizado como molde para duas reações de PCR: a primeira para amplificação do fragmento mutagenizado (B) e a segunda para amplificação do gene *glnB* de *A. brasilense* (A). Os oligonucleotídeos utilizados em cada reação são representados por setas. O oligonucleotídeo mutagênico contém a substituição que confere a troca do códon Y51-F que é representada no esquema por um "X". O produto da reação "A" foi digerido com *KpnI*/*SalI* e o produto de amplificação "B" foi digerido com *SalI*/*SacI*. Os fragmentos foram ligados ao vetor pUC18 digerido com as mesmas enzimas. FONTE: A autora (2009), adaptado de <http://www.genscript.com/site2/document>.

4.10 Subclonagem dos genes *glnB* e *glnBY51F* no vetor pLAFR3.18

Para a expressão das proteínas GlnB e GlnBY51F em *A. brasilense* os genes *glnB-His* e *glnBY51-F-His* foram isolados dos plasmídeos pJI8 e pJIB51, respectivamente, utilizando as enzimas *XbaI/HindIII* e ligados ao vetor pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas. As colônias obtidas após transformação das reações de ligação em *E. coli* DH10B tiveram seu DNA isolado e a clonagem foi confirmada por amplificação dos insertos, utilizando os oligonucleotídeos universal e reverso, que anelam à sequência do vetor, e análise em gel de agarose 1%. Foram obtidos os plasmídeos denominados pJI8.2 e pJI3.51, que expressam as proteínas GlnB-₆His e GlnBY51F-₆His. O sequenciamento dos insertos permitiu confirmar as clonagens em fase de leitura corretas.

4.11 Subclonagem dos genes *glnB*, *glnBL13P*, *glnBV100A* e *glnBY51F* no vetor pET29a(+)

Para a clonagem dos genes *glnB*, *glnBL13P*, *glnBV100A* e *glnBY51F* no vetor pET29a(+) os plasmídeos pJI8, pJI6, pJI9 e pJIB51 foram digeridos com as enzimas *NdeI/BamHI* e o produto da clivagem foi ligado ao vetor pET29a(+) digerido com as mesmas enzimas. Esse vetor permite a superexpressão das proteínas a partir de promotor do bacteriófago T7 (Novagem). As reações de ligação foram transformadas em *E. coli* DH10B e plaqueadas em meio LA contendo 50 µg/mL de canamicina (Km⁵⁰). Os plasmídeos recombinantes foram isolados e seus perfis de restrição determinados. Foram obtidos 3 clones de interesse: pJI2.6 (pET29a(+)) contendo o gene *glnBL13-P*), pJI2.9 (pET29a(+)) contendo o gene *glnBV100-A*) e pJIB53 (pET29a(+)) contendo o gene *glnBY51F*), cuja integridade de sequência foi confirmada por sequenciamento dos insertos.

4.12 Conjugação bacteriana

Os plasmídeos pJI8 e pJIB3.51 foram transformados em *E. coli* S17.1 que apresenta os genes *tra* de transferência bacteriana. As culturas foram crescidas em meio LB (2,5mL) Tc¹⁰, a 37°C e 120 rpm por 18h. Após esse período, 30 µL das culturas foram inoculados em 2,5 mL de LB sem antibiótico, a 37°C, durante 4h.

Paralelamente, as culturas de *A. brasilense* estirpe LFH3 foram crescidas por 18h a 30°C em meio NFbH contendo 50 mmol/L de fosfato e 20 mmol/L de amônio (NFbHPN) sem antibiótico. Após esse período, 100 µL da cultura de *A. brasilense* foram colocados em uma placa contendo uma mistura NFbHPN/LA (1:1) e a ela foram misturados 10 µL da cultura de *E. coli*. As placas foram incubadas à 30°C, durante 24 h. Após esse período, a massa de células foi removida e ressuspensa em 1 mL de meio líquido NFbHP e 100 µL dessa suspensão foram plaqueados em meio NFbHPN contendo os antibióticos adequados. As placas foram incubadas novamente a 30°C e as colônias obtidas coletadas.

4.13 Determinação da atividade de nitrogenase em *A. brasilense*

Para a determinação da atividade de nitrogenase em *A. brasilense* as estirpes foram crescidas em meio NFbHP contendo 4 mmol/L NH_4Cl ou 5 mmol/L de glutamato e 1% de LB, a 30°C e 120 rpm. Após cerca de 18h, foram injetados acetileno (10% do volume de fase gasosa) nos frascos de cultura fechados com rolhas de borracha e a formação de etileno foi monitorada por cromatografia gasosa em cromatógrafo Varian Star 3400 equipado com coluna Porapak N e um detector de ionização de chama. O gás de arraste foi nitrogênio superseco (20 mL/min) e as temperaturas da coluna e do detector foram 110°C e 200°C, respectivamente (DILKORTH, 1966; SHOLLHORN e BURRIS, 1967; PEDROSA e YATES, 1984).

4.14 Eletroforese de proteínas sob condição desnaturante (SDS-PAGE)

As separações eletroforéticas de proteínas sob condições desnaturantes foram realizadas conforme descrito por LAEMMLI (1970).

Para separação eletroforética das proteínas para ensaios de imunodeteção 33 µL das culturas de *A. brasilense* foram coletadas e misturadas com 17 µL de tampão de amostra (2% SDS; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625 mol/L Tris.HCl pH 6,8 e 5% β-mercaptoetanol). Para separação eletroforética de proteínas de extratos celulares, os mesmos tiveram sua concentração determinada por Bradford e cerca de 5 µg de proteína foram misturados ao tampão de amostra. As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida, em um sistema vertical, seguindo as recomendações do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a

180 V em tampão de corrida (3 g/L Tris-base, 14 g/L glicina, 1 g/L SDS), por 1 a 2 horas e corados com Coomassie blue ou utilizados para ensaios de imunodetecção. Para a visualização das proteínas GlnB selvagem e mutantes e NifH de *A. brasilense* foram utilizados géis de poliacrilamida 12,5%.

4.15 Imunodetecção das proteínas GlnB selvagem e mutantes, NifA e NifH de *A. brasilense*

Para a imunodetecção das proteínas GlnB e NifH de *A. brasilense* as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e transferidas para membranas Hybond-P ECL (GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco (Pharmacia LKB-Multiphor II).

Sobre uma placa do anodo do sistema foram depositadas duas camadas de papel 3M, embebidas em tampão A1 (Tris.HCl 0,3 mol/L pH 10, metanol 20%) e uma camada de papel-filtro em tampão A2 (Tris.HCl 25 mmol/L pH 10, metanol 20%). Uma membrana Hybond-P foi depositada acima e, sobre a mesma, o gel de SDS-PAGE, seguido de 3 camadas de papel 3M embebidas em tampão C (Tris.HCl 25 mmol/L pH 10, ácido capróico 40 mmol/L, metanol 20%). O sistema foi fechado pela placa do cátodo e a transferência foi realizada a 80 mA por 1 hora. Para avaliar a eficiência do processo, foi utilizado um marcador de proteína pré-corado (New England Biolabs). Após a transferência, a membrana foi incubada com uma solução de leite em pó desnatado 5% em TBS-T (2,42 g/L Tris pH 7,6; 8 g/L NaCl; 1 mL/L Tween 20) por 1 hora, sob temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi novamente lavada com TBS-T e incubada por uma hora com uma solução de leite 1% em TBS-T, contendo o anticorpo primário anti-GlnB (1:5000) (gentilmente cedido por Dra. Luíza Maria Araújo-UFPR) ou anti-NifH (1:5000) (gentilmente cedido por Dr. Luciano F. Huergo-UFPR). As membranas foram lavadas por 15 minutos com TBS-T, seguido de 3 lavagens adicionais, por 5 minutos cada. Em seguida, as membranas foram incubadas com 15 mL de solução contendo o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com peroxidase – GE Healthcare) na diluição de 1:5000, à temperatura ambiente, por 1 hora. Novamente foram realizadas lavagens (3 vezes, durante 5 minutos) e as membranas foram reveladas utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) conforme recomendado pelo fabricante.

4.16 Superexpressão e purificação das proteínas GlnB, GlnBV100-A, GlnBL13-P e GlnBY51F de *A. brasilense*

Para a superexpressão e purificação das proteínas GlnB selvagem e mutantes foi utilizada inicialmente a metodologia descrita por Araújo e colaboradores (2008). Novos testes de indução e metodologia de purificação foram realizados com o intuito de melhorar o rendimento e pureza das preparações.

Para a metodologia descrita por Araújo (protocolo 1), as culturas de *E. coli* estirpe BL21 (λ DE3) contendo os plasmídeos pLH25, pJI2.6, pJI2.9 e pJI53 foram crescidas em 5 mL de meio LB e canamicina durante 16h e então, inoculadas em 800 mL de LB contendo canamicina, crescidas em agitador a 37°C até D.O₆₀₀ 0,5. A expressão protéica foi induzida por IPTG (0,5 mmol/L), por 4h. As células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão contendo 50 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, e 20% de glicerol, rompidas por sonicação (15 pulsos de 15 segundos) e os restos celulares removidos por centrifugação a 30.000 X g por 30 minutos. As frações solúveis das preparações foram aplicadas em uma coluna Hi-Trap heparina de 5mL (GE Healthcare) acoplada em aparelho AKTA e equilibrada com tampão A (50 mmol/L Tris HCl pH 7.5, 100 mmol/L KCl e 1 mmol/L EDTA) e eluídas por um gradiente linear de KCl 0,1-1,0 mol/L.

4.16.1 Teste de indução de expressão das proteínas GlnB de *A. brasilense*

Com o intuito de melhorar o rendimento das preparações das proteínas do tipo PII, foram realizados testes de indução da proteína GlnB sob as temperaturas de 20, 30 e 37°C. Para isso, 30 μ L das culturas de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo o plasmídeo pLH25 foram inoculadas em três frascos contendo 10 mL de meio LB e 30 mmol/L de NH₄Cl. No frasco 1 foram adicionados 0,5 mmol/L de IPTG e a indução ocorreu a 20°C, durante 16h. Os frascos 2 e 3 foram mantidos a 30 e 37°C, respectivamente, até atingirem D.O₆₀₀ 0,5, quando foram adicionados 0,5 mmol/L de IPTG e induzidas por 3h. As culturas foram centrifugadas e as células lisadas por sonicação (5 ciclos de 15 segundos). As proteínas do extrato celular foram separadas por eletroforese em gel desnaturante 12,5%.

4.16.2 Teste de eficiência de tratamento térmico para a purificação de GlnB

A eficiência do tratamento térmico como etapa de pré-purificação da proteína GlnB foi testada. Três mililitros de uma cultura de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo o plasmídeo pLH25 induzida durante 3h com 0,5 mmol/L de IPTG a 37°C, foram centrifugados e as células ressuspensas em 400 μ L de tampão de sonicação (50 mmol/L Tris.HCl pH7,5, 50 mmol/L KCl e 20% de glicerol). As células foram lisadas por sonicação (5 pulsos de 15 segundos, com intervalos de 30 segundos) e o extrato celular foi dividido em 4 tubos. O tubo foi inoculado em banho-maria a 80°C, durante 3 minutos. O tubo 2 foi inoculado sob a mesma temperatura durante 5 minutos e os tubos 3 e 4 foram inoculados a 100°C durante 3 e 5 minutos, respectivamente. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos e o sobrenadante foi aplicado em gel SDS-PAGE 12,5% e em gel não desnaturante e corados com Coomassie blue.

4.16.3 Purificação de GlnB selvagem e mutantes de *A. brasilense* (protocolo 2)

As culturas de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo os plasmídeos pLH25, pJI2.6, pJI2.9 e pJIB53 foram crescidas em 10mL de meio LB a 37°C durante 8h e inoculadas em 1000 mL de meio LB contendo canamicina (50 μ g/mL), 30 mmol/L de NH_4Cl e 0,5 mmol/L IPTG. As culturas foram mantidas sob agitação (240 rpm) e 20°C, durante 18h. As células foram mantidas em gelo por pelo menos 30 minutos e coletadas por centrifugação a 30.000 X g, durante 5 minutos. A massa celular obtida foi ressuspensa em 20 mL de tampão de lise (50 mmol/L Tris.HCl pH7,5, 50 mmol/L KCl e 20% de glicerol), lisadas por prensa francesa (3 vezes) e submetidas a tratamento térmico a 80°C, durante 3 minutos. Ao extrato celular foi adicionado um inibidor de protease livre de EDTA (1 pastilha: 50 mL extrato, Roche) e então clarificado por centrifugação a 30.000 X g, durante 30 minutos. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna heparina Hi-Trap (GE Healthcare) equilibrada com 10 volumes de coluna de tampão A (50 mmol/L Tris HCl pH 7,5, 50 mmol/L KCl) em aparelho AKTA (GE Healthcare) e fluxo de 1mL/min. A coluna foi lavada com 5 a 10 volume de coluna de solução 0,1 mol/L de KCl. No início de eluição das proteínas GlnB selvagem e mutantes (cerca de 0,3 mol/L KCl), o gradiente foi mantido constante, até que toda a proteína fosse eluída, quando então a concentração de KCl aumentou gradativamente até 0,6 mol/L, em um total de 10 volumes de coluna.

Foram coletas 50 alíquotas de 1 mL das frações eluídas e 5 µL de cada foram aplicados em gel desnaturante e corados com Coomassie Blue. As frações de maior pureza foram agrupadas, suas concentrações determinadas e armazenadas a -80°C.

As proteínas GlnB, GlnK e GlnB-UMP de *H. seropedicae* e GlnB de *A. brasilense* utilizadas como controle de migração nos experimentos de migração em gel nativo (item 4.18) foram gentilmente cedidos por Dra. Ana Cláudia Bonatto-UFPR e Dr. Luciano F. Huergo- UFPR. As proteínas GlnZ e GlnZ-UMP utilizadas nos experimentos de formação de heterotrímeros (item 4.21) foram gentilmente cedidas por Luciano F. Huergo. A proteína GlnK de *E. coli* purificada utilizada como controle de migração nos géis de eletroforese desnaturante (item 4.14) foi gentilmente cedida por Jeremy Thornton- John Innes Centre, Reino Unido.

4.17 Ensaios de uridililação das proteínas GlnB, GlnBV100-A, GlnBL13-P e GlnBY51F de *A. brasilense*

Os ensaios de uridililação *in vitro* foram realizados em um sistema contendo 10 µmol/L de proteínas GlnB selvagem ou mutantes, 1 mmol/L ATP, 1 mmol/L UTP, 2 mmol/L 2-oxoglutarato, e 0,1 ou 0,2 µmol/L de GlnD, em tampão contendo 100 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 100 mmol/L NaCl e 25 mmol/L MgCl₂. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos e a reação parada após adição de 25 mmol/L EDTA e 5 µL de tampão de amostra para corrida em gel nativo. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel nativo e por espectrometria de massa Maldi-Tof (Bruker Daltonics).

4.18 Eletroforese sob condições nativas

As amostras a serem analisadas foram misturadas em 5 µL de tampão de amostra (6,5 mmol/L Tris.HCl pH 6,8, 10 % glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) e separadas por eletroforese não desnaturante conforme descrito por Forchhammer e Tandeau de Marsac (1994). O gel empilhador continha 2,5% acrilamida (solução estoque 10% de acrilamida e 2,5% de bis-acrilamida), 62,5 mM Tris-H₃PO₄ pH 6,9, 0,031% Nonidet P-40, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% TEMED. O gel separador continha 9% de acrilamida (relação acrilamida:bis-acrilamida de 29:1), 450 mM Tris-

HCl pH 8,9, 0,025% Nonidet P-40, 0,1% persulfato de amônio e 0,1%. TEMED. As corridas foram realizadas a 100 V por 3 a 4 horas em tampão de corrida Tris (5 mmol/L), glicina (38,4 mmol/L) e coradas com Coomassie blue. A análise densitométrica das bandas obtidas foi realizada pelo programa Labwork (UVP).

4.19 Espectrometria de massa MALDI-TOF

Para a análise espectrométrica de massa por MALDI-TOF foi utilizado o protocolo descrito por Chaves e colaboradores (2007).

Para a análise da uridililação das proteínas GlnB selvagem e mutantes 1 µL das amostras submetidas à reação de uridililação foram coletadas nos tempos 0, 30 e 60 minutos, misturadas a 9 µL de uma solução saturada de ácido sinapínico, adicionados à placa para MALDI e submetidos às análises em espectrômetro Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) utilizando modo linear positivo, 20 kV de aceleração e massa de aquisição de 5-20 kDa.

Para determinação da massa de peptídeos tripticos, as proteínas a serem analisadas após separação por SDS-PAGE foram retiradas do gel e o corante removido pela adição de 30 µL de solução 75 mmol/L de bicarbonato de amônio e 40% de etanol. A solução foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 10 minutos e o procedimento repetido até remoção completa do corante. Em seguida, a banda foi coberta com acetonitrila 100% e incubada por 5 minutos por duas vezes e o sistema seco por centrifugação a vácuo. As amostras foram digeridas com tripsina (10 µg/mL) (12h a 37°C) em solução contendo 50 mmol/L de bicarbonato de amônio pH 8,0. Os peptídeos foram extraídos com uma solução de acetonitrila 50% e TFA 5% (30 µL) em banho sônico por 10 minutos. A solução sobrenadante foi coletada e o procedimento repetido por mais 3 vezes. As amostras foram evaporadas a vácuo e dissolvidas em 2 µL de solução de TFA 0,1%. Dois microlitros da amostra foram misturados a 1 µL de matriz (5 mg HCCA/mL de solução acetonitrila 5% e TFA 1/1), depositados em uma placa de MALDI e submetidos às análises espectrométrica utilizando modo refletivo positivo, 20 kV de aceleração e faixa de massa de aquisição de 800-3200 Da.

Os espectros de massa foram analisados através do programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), utilizando a relação sinal/ruído de 30 e pelo programa Mascot.

4.20 Modelagem *in silico* das proteínas GlnB, GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de *A. brasilense*

As estruturas das proteínas GlnB de *A. brasilense* selvagem e mutantes foram modeladas utilizando os programas 3Djigsaw (Bates *et al.*, 2001; <http://www.bmm.icnet.uk/~3djigsaw/>) e o programa RASMOl (<http://rasmol.org>).

4.21 Ensaio de desnaturação/renaturação de GlnB e GlnZ de *A. brasilense*

As proteínas GlnB, GlnB-UMP₃, GlnZ e GlnZ-UMP₃ (5 µg total) foram misturadas em tampão Tris.HCl pH 7,5 (100 mmol/L), KCl (100 mmol/L) e MgCl₂ (25 mmol/L). Quando indicado, as proteínas foram desnaturadas por fervura durante 5 minutos e mantidas no gelo até serem aplicadas em gel nativo (item 4.18).

4.22 Determinação das constantes de dissociação das proteínas PII e os efetores 2-oxoglutarato, ATP, ADP e AMP

A determinação das constantes de dissociação de efetores ATP, ADP, AMP e 2-oxoglutarato à proteína GlnB foi realizada por microcalorimetria. Para isso, a proteína GlnB selvagem ou mutantes de *A. brasilense* foram tituladas com seus efetores a 28°C em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal Inc.) As proteínas GlnB purificadas (50-120 µmol/L) foram dialisadas durante 12h, a 4°C, em tampão 50 mmol/L Tris.HCl pH 7,5, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂ na ausência e presença de 5 mM de 2-oxoglutarato (para a titulação de ATP, ADP ou AMP), ou 5 mM de ATP (para a titulação de 2-oxoglutarato). Os tampões foram filtrados antes do uso. Após esse período, a concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A determinação da concentração da solução titulante foi obtida através da fórmula:

$$M_i = 1400.M.n (1.2 + 6/c^{1/2})/(v_i.n_i);$$

Onde: M_i = concentração do ligante na solução titulante (mmol/L)
1400= (µL) volume da célula de reação

M= concentração de GlnB (mmol/L) a ser aplicada na célula de reação (entre 50-150 μ mol/L).

n = sítios de ligação do ligante à molécula (3)

c= relação entre titulante ligado/titulante livre (100)

v_i = volume de injeção (5 μ L)

n_i = número de injeções (20)

As soluções titulantes foram preparadas no mesmo tampão em que a proteína foi dialisada para a análise e tiveram seu pH corrigido utilizando uma solução super saturada de KOH preparada também na solução tampão. Todas as soluções foram filtradas antes do uso. As titulações das proteínas PII ocorreram em uma rotação de 300 rpm e foram realizadas utilizando uma seringa de injeção de capacidade para 247 μ L. A variação de calor gerada pela diluição do ligante em tampão foi considerada como linha de base dos experimentos e foi obtida pela titulação do tampão na ausência da proteína.

A análise dos resultados e a remoção das linhas de base de cada experimento foram realizadas pelo programa Origin 5.0 (Microcal).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da mutação GlnBY51-F na ativação da proteína NifA

Em *A. brasilense* a atividade da proteína NifA é controlada por GlnB, dado que em um mutante *glnB*⁻ de *A. brasilense* *nifA* é transcrito, porém *nifH* não é expresso (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993; ARSENE *et al.*, 1996). Aparentemente, a forma responsável pela ativação de NifA é a forma GlnB-UMP (VAN DOMMELLEN *et al.*, 2002). Esta hipótese foi baseada no fato de que mutantes *glnD*⁻, incapazes de uridililar a proteína GlnB, são incapazes de fixar nitrogênio. Logo, NifA estaria inativa na ausência de GlnB-UMP, sendo, assim, incapaz de ativar a transcrição dos genes *nif* (ARSENE *et al.*, 1996; VAN DOMMELLEN *et al.*, 2002).

Para verificar se somente a forma uridililada de GlnB é capaz de ativar NifA, um mutante *glnBY51-F* de *A. brasilense* foi construído por PCR mutagênica, utilizando o plasmídeo pJl8 (que contém o gene *glnB* de *A. brasilense* fusionado à seis resíduos de histidina na porção N-terminal) como molde (item 4.9). O fragmento contendo a mutação de interesse foi clonado no vetor pUC18, gerando o plasmídeo pJlB51, e sequenciado. Somente o resíduo de interesse foi mutagenizado. Em seguida, os genes *glnB* e *glnBY51F* fusionados à seis resíduos de histidina GlnB-His₆ foram subclonados em um vetor de ampla faixa hospedeira, pLAFR3.18, estável em *A. brasilense* (item 4.10). A confirmação da clonagem foi feita utilizando uma reação de PCR com os oligonucleotídeos reverso e universal e células das colônias transconjugantes obtidas. Os clones obtidos tiveram seus insertos sequenciados e foram denominados pJl8.2 e pJl3.51, respectivamente.

Os plasmídeos pJl8.2 e pJl3.51 foram transformados em *E. coli* estirpe S17.1, que possui os genes *tra* e transferidos para *A. brasilense* estirpe LFH3 (mutante *glnB*⁻) por conjugação. A atividade de nitrogenase dos transconjugantes obtidos foi então determinada (item 4.13). A Figura 8 mostra as atividades específicas da nitrogenase das estirpes FP2 (selvagem), LFH3 (mutante *glnB*⁻), LFH3 contendo os plasmídeos pJl8.2, (que expressa GlnB-His₆), e pJl3.51 (que expressa GlnBY51F-His₆). A estirpe FP2 apresentou uma atividade de nitrogenase de 36 nmol de C₂H₄. min⁻¹. mg⁻¹. O mutante LFH3 foi incapaz de fixar nitrogênio, conforme descrito por Huergo (2006). O fenótipo desta estirpe foi complementado quando o plasmídeo pJl8.2, que expressa GlnBHis₆ foi introduzido. Por outro lado, o plasmídeo pJl3.51

não foi capaz de restaurar o fenótipo Nif^- desta estirpe, sugerindo que a forma uridililada de GlnB (GlnB-UMP) é a forma requerida para a ativação de NifA e expressão da nitrogenase em *A. brasilense*.

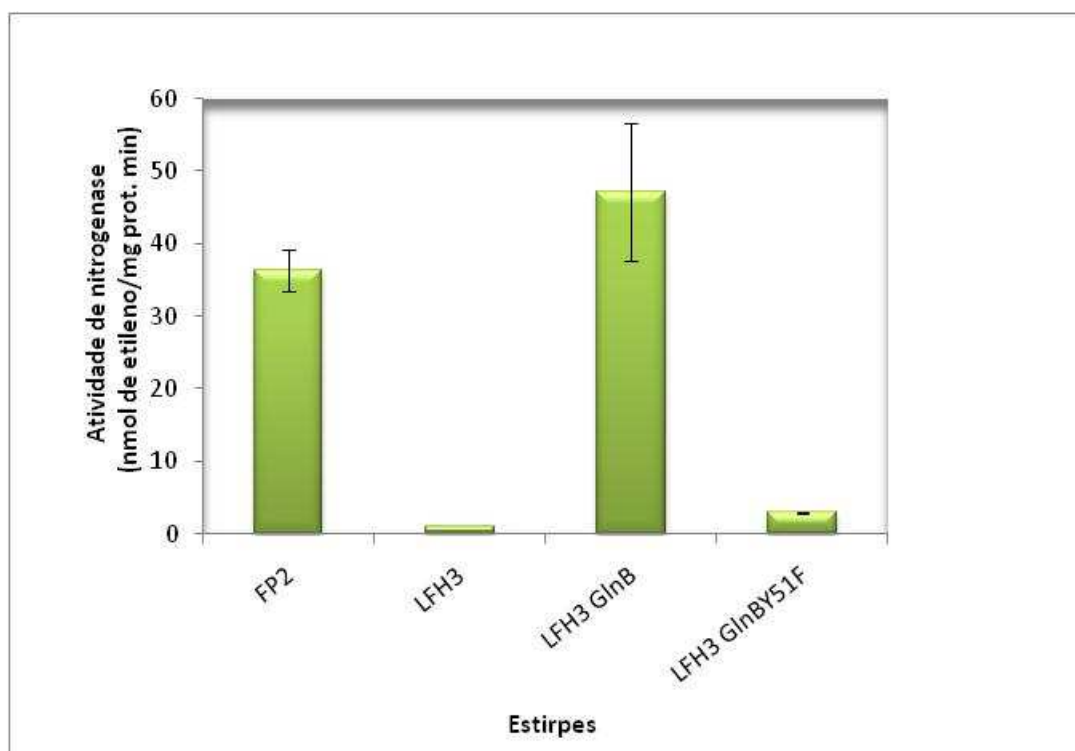


FIGURA 8: ATIVIDADE DE NITROGENASE DE *A. brasilense* ESTIRPES FP2 E LFH3 EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS GlnB E GlnBY51F. Atividade de nitrogenase em *A. brasilense* estirpes FP2, LFH3 (mutante *glnB*), LFH3 pJl8.2 (GlnB-His₆, *plac*) e LFH3 pJlB53 (GlnBY51F-His₆, *plac*). As culturas de *A. brasilense* foram crescidas em meio NFbHP líquido contendo 5 mmol/L de glutamato. Após 18h de crescimento a 30°C, foi injetado acetileno às culturas e a formação de etileno monitorada por cromatografia gasosa. FONTE: A autora (2009).

A expressão das proteínas GlnB-His₆ e GlnBY51F-His₆ nas estirpes transconjugantes foi confirmada por imunodetecção. Amostras das culturas dos transconjugantes foram coletadas após determinação da atividade de nitrogenase e submetidas à eletroforese de proteínas (SDS-PAGE), seguida de imunodetecção utilizando anticorpos policlonais anti-GlnB. A Figura 9 mostra na linha 1 uma banda referente à proteína GlnB purificada (50 ng). A linha 2 indica a presença de uma banda de migração eletroforética correspondente à GlnB expressa na estirpe

selvagem (FP2). Como esperado, não foi detectada nenhuma banda relativa à GlnB na estirpe LFH3 (linha 3). Na linha 4 foi evidenciada uma banda de migração retardada comparada a proteína GlnB selvagem, que corresponde à proteína GlnB fusionada à 6 resíduos de histidina, expressa a partir do plasmídeo pJI8.2 no mutante LFH3. Uma banda de mesma migração eletroforética aparece na linha 5 e corresponde à GlnBY51F-His₆ expressa na estirpe LFH3 a partir do plasmídeo pJI3.51. Uma segunda banda de maior migração eletroforética pode ser identificada e possivelmente corresponde à proteína GlnZ, cuja expressão ocorre em baixos níveis na presença de amônio e pode apresentar reação cruzada com o anticorpo policlonal anti-GlnB. O resultado indica que a proteína GlnBY51F-His₆ é expressa na estirpe LFH3, no entanto não é capaz de complementar seu fenótipo Nif⁻.

Além de controlar a atividade NifA, a proteína GlnB não modificada de *A. brasilense* interage com a enzima DraT, que promove ADP-ribosilação e inativação de NifH (KLASSEN *et al.*, 2005; HUERGO *et al.*, 2009). Como GlnBY51F é incapaz de ser uridililado em baixos níveis de amônio, esta proteína passou a sinalizar permanentemente altos níveis de íons amônio, e NifH poderia estar expressa, porém inativa por ADP-ribosilação. Para verificar se NifH foi expresso, mas ADP-ribosilado na estirpe LFH3 contendo o plasmídeo pJI3.51 (expressando GlnBY51F) as células das culturas testadas para nitrogenase foram coletadas, lisadas, e as proteínas separadas por eletroforese. As proteínas foram então transferidas para uma membrana e incubadas com anticorpo anti-NifH de *A. brasilense*. A Figura 9 mostra a presença de NifH em culturas desreprimidas nas estirpes FP2 (linha 2) e LFH3 contendo o plasmídeo pJIB8.2 (GlnB-His₆) (linha 4). Não foi observada expressão de *nifH* nas estirpes LFH3 (linha 3) ou no transconjugante LFH3 expressando a proteína GlnBY51F (linha 5). Esses resultados mostram que a ausência de atividade da nitrogenase é decorrente da ausência de expressão de genes *nif* e indica que NifA não é ativada pela proteína GlnBY51F e que a uridilação de GlnB é essencial para a ativação da proteína NifA em *A. brasilense*.

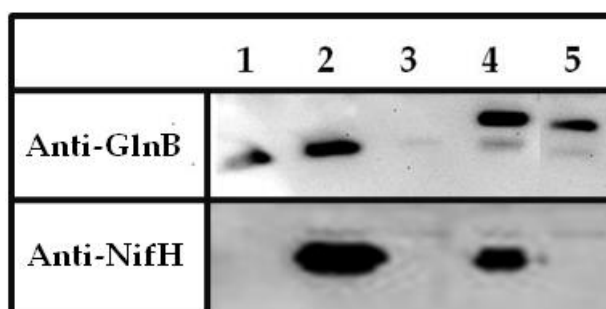


FIGURA 9. EXPRESSÃO DE GlnB-His₆, GlnBY51F-His₆ e NifH EM *A. brasilense* Cinco microgramas de proteínas de extratos celulares de transconjugantes de *A. brasilense* contendo os plasmídeos pJl8.2 e pJl3.51, crescidos em condições de fixação de nitrogênio, foram separadas por SDS-PAGE e submetidas à imunodeteção utilizando um anticorpo primário anti-GlnB ou anti-NifH de *A. brasilense*. Linha1: proteína GlnB purificada (50 ng); linha 2: FP2; linha3: LFH3 (mutante *glnB*); linha 4: LFH3 pJl8.2 (GlnB-His₆, *p/ac*); linha 5: LFH3 pJlB53 (GlnBY51F-His₆, *p/ac*). As formas fusionada à cauda de histidina (a) ou selvagem (b) de GlnB são indicadas por setas. FONTE: A autora (2009).

Em *R. rubrum*, uma estirpe mutante expressando GlnBY51F (UR659) apresenta 10-20 % da atividade de nitrogenase da estirpe selvagem, indicando que a uridililação favorece, mas não é essencial para a ativação da proteína NifA neste organismo (ZHANG *et al.*, 2000). De fato, a expressão de *nifA* de *R. rubrum* a partir de um plasmídeo com alto número de cópias no mutante UR659, permitiu uma atividade da nitrogenase neste mutante semelhante à obtida na estirpe selvagem. Esse efeito não foi observado no mutante *glnB*⁻ (UR717), indicando que GlnB é necessária para a ativação de NifA e que, embora a presença de GlnBY51F seja favorável para a ativação de NifA, GlnB não modificada é capaz de ativar a proteína NifA deste organismo (ZHANG *et al.*, 2000). O efeito de GlnB no controle pós-traducional da nitrogenase via DraT/DraG também foi avaliado no mutante UR659. A adição de 10 mmol/L de amônio levou à inativação da proteína NifH mais rápida nesta estirpe do que na estirpe selvagem e ambas as estirpes foram capazes de recuperar totalmente a atividade inicial da nitrogenase após o consumo de amônio. O resultado indica que apesar de DraT apresentar alteração de atividade neste mutante, a atividade de nitrogenase pode ser restabelecida independentemente da uridililação de GlnB após o consumo de amônio (ZHANG *et al.*, 2000).

Os resultados do presente trabalho não permitiram descartar um efeito direto de GlnBY51F sobre a atividade de DraT. Nas condições testadas, a falta de

atividade de NifA inibe a síntese de NifH, impedindo que se avalie o efeito direto de GlnBY51F sobre DraT. A proteína DraT é capaz de ligar-se tanto à GlnB quanto à GlnB-UMP *in vitro*, embora com diferentes afinidades e resposta à presença de ATP, ADP e 2-oxoglutarato (HUERGO *et al.*, 2009). Os resultados obtidos por Huergo e colaboradores (2009) sugerem que a interação GlnB/DraT ocorra via alça-T. Embora a uridililação de GlnB seja importante para sua interação com DraT, é possível que *in vivo* a proteína GlnBY51F seja ainda capaz de sinalizar os níveis de ATP, ADP e 2-oxoglutarato para o sistema DraT/DraG.

5.2 Superexpressão e purificação das proteínas GlnB, GlnBL13-P, GlnBV100A e GlnBY51-F

Previamente (INABA, 2005) foram construídos plasmídeos contendo o gene *glnB* de *A. brasilense* contendo mutações pontuais através de PCR mutagênica, empregando baixas concentrações de dNTP e manganês. Os plasmídeos obtidos codificam para as proteínas GlnBL13P e GlnBV100A (INABA, 2005). Assim como GlnBY51F, estas proteínas também foram incapazes de restaurar o fenótipo Nif⁻ de uma estirpe mutante *glnB*⁻ de *A. brasilense*. Os resultados sugeriram que a substituição de um único resíduo é suficiente para produzir uma proteína GlnB inativa e que os resíduos L13, V100 e Y51 são essenciais. As proteínas do tipo PII apresentam resíduos altamente conservados e os resíduos substituídos nestas proteínas mutantes encontram-se nessas regiões. A Figura 10 apresenta o alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas PII de diversos organismos com as proteínas mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
AbGlnB:	MKKIEAIKP	FKLDEVKEAL	HEVGIGKQITV	TEAKGFGGRQK	GHTELYRGAE	YVVDLFLPKVK	IEVVMEDSLV	ERAIEAIQQA	AHTGRIGDGK	IFVTPVEEVV	RIRTEKGGD	AI
AbGlnZ:	MKLVMIAIKP	FKLDEVREAL	TSLGIQGLTV	SEVKGFGGRQK	GQTELYRGAE	YSVSFLPKVK	VEVAVSDQY	EQVVEAIQQA	ANTGRIGDGK	IFVLDIAQAV	RIRTGETNTE	AL
AbGlnBL13P:	MKKIEAIKP	FKPDEVKEAL	HEVGIGKQITV	TEAKGFGGRQK	GHTELYRGAE	YVVDLFLPKVK	IEVVMEDSLV	ERAIEAIQQA	AHTGRIGDGK	IFVTPVEEVV	RIRTEKGGD	AI
AbGlnBY51F:	MKKIEAIKP	FKLDEVKEAL	HEVGIGKQITV	TEAKGFGGRQK	GHTELYRGAE	FVVDLFLPKVK	IEVVMEDSLV	ERAIEAIQQA	AHTGRIGDGK	IFVTPVEEVV	RIRTEKGGD	AI
AbGlnBV100A:	MKKIEAIKP	FKLDEVKEAL	HEVGIGKQITV	TEAKGFGGRQK	GHTELYRGAE	YVVDLFLPKVK	IEVVMEDSLV	ERAIEAIQQA	AHTGRIGDGK	IFVTPVEEVA	RIRTEKGGD	AI
EcGlnB:	MKKIDAIKP	FKLDDVREAL	AEVGITGMV	TEVKGFGGRQK	GHTELYRGAE	YVVDLFLPKVK	IEIIVPDDIV	DTCVDTIIRT	AQTGRIGDGK	IFVFDVARVI	RIRTEGEDDA	AI
EcGlnK:	MKLVTVIKP	FKLEDVREAL	SSIGIQGLTV	TEVKGFGGRQK	GHAELYRGAE	YSVNFLPKVK	IDVAIADDQL	DEVIDIVSKA	AYTGKIGDGK	IFVAELQRVI	RIRTEGEADA	AL
HsGlnB:	MKQVTAIKP	FKLDEVRESL	AEVGVIGLTV	TEVKGFGGRQK	GHTELYRGAE	YVVDLFLPKVK	IEVVVDKVV	EQAVDAIIKA	ARTGKIGDGK	IFVQVEQVI	RIRTEGETPD	AV
HsGlnK:	MKLITAIKP	FKLDEVREAL	SAIGVQGITV	TEVKGFGGRQK	GHTELYRGAE	YVVDLFLPKTK	IEAAVDDAIV	ERALEAIETA	ARTGKIGDGK	IFVQDLDDVI	RIRTEGETKD	AL
RrGlnB:	MKKIEAIKP	FKLDEVKEAL	HEIGLQGITV	TEAKGFGGRQK	GHTELYRGAE	YVVDLFLPKVK	IELVIEDALV	ERAIEAIQQA	AHTGRIGDGK	IFVVAIEEAI	RIRTERGGD	AI
RrGlnK:	MKLIMAIKP	FKLDEVCEAL	TSLDVHGLTV	SEVKGFGGRQK	GQTELYRGAE	YQVNFLPKVK	IEVAVSDGLA	DLAVEAICNA	ARTDRIGDGK	VEFYDLDKIV	RIRTEIGIDAD	AL
Clustal Consensus	** : .****	** : ** *	.. : ** *	:* :*****	:* :*****	:* :*****	:* :*****	:* :*****	:* :*****	:* :*****	:* :*****	:* :*****

FIGURA 10. ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNAS DO TIPO PII. As proteínas GlnB (AbGlnB), GlnZ (AbGlnZ), GlnBL13P (Ab GlnBL13P), GlnBY51F (AbGlnBY51F) e GlnBV100A (AbGlnBV100A) de *A. brasilense* foram alinhadas com as sequências de aminoácidos das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* (Ec), *H. seropedicae* (Hs) e *R. rubrum* (Rr). Os asteriscos representam resíduos conservados. FONTE: A autora (2009).

Na tentativa de caracterizar *in vitro* o efeito das mutações obtidas, os clones pJIB51 (contendo o gene *glnBY51-F-His*), pJ16 (contendo o gene *glnBL13-P-His*) e pJ19 (contendo os gene *glnBV100-A-His*) foram digeridos *Nde*I e *Hind*III e subclonados no vetor de expressão pET29a(+). Os clones foram sequenciados e denominados pJ12.6, pJ12.9 e pJIB53.

A expressão das proteínas mutantes pelas construções obtidas foi avaliada. Para isso, os plasmídeos pJ12.6, pJ12.9 e pJIB53 foram transformados em *E. coli* estirpe BL21 (λ DE3) e a expressão protéica induzida com IPTG (0,5 mmol/L) durante 4h, a 37°C. A Figura 11 apresenta o perfil de migração das proteínas induzidas em gel desnaturante corado com Coomassie blue. Bandas de tamanhos próximos a 15 KDa foram visualizadas e correspondem às proteínas GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F superexpressas.

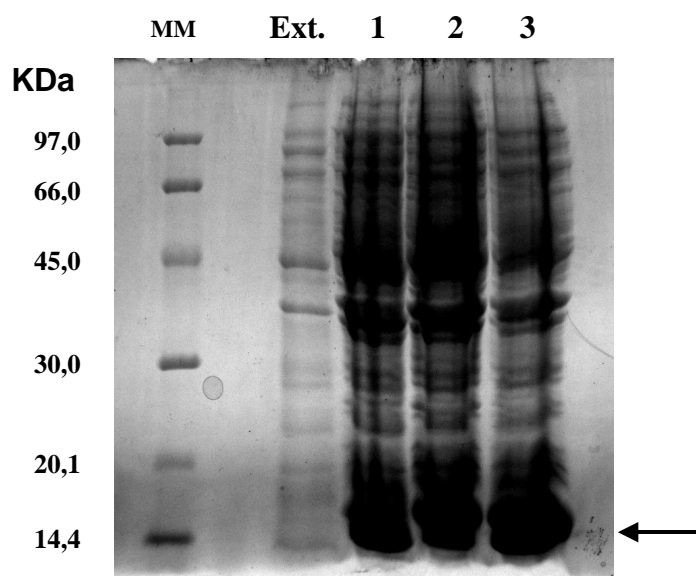


FIGURA 11. ELETROFORESE DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE *E. coli* BL21 λDE3 EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS GlnBV100A, GlnBY51F E GlnBL13P. Culturas de *E. coli* BL21 λDE3 contendo os plasmídeos pJl2.6, pJl2.9 e pJlB53 induzidas com 0,5 mmol/L de IPTG, durante 4h a 37°C foram misturadas ao tampão de amostra, fervidas por 1 min, centrifugadas e aplicados (10 µL) em gel SDS-PAGE 12,5%. MM: marcador de massa molecular (GE Healthcare); Ext: *E.coli* BL21 λDE3 (Ec) contendo o plasmídeo pJl2.9, crescido na ausência de IPTG (controle negativo); 1: Extrato de Ec contendo o plasmídeo pJl2.9; 2: Extrato de Ec contendo o plasmídeo pJl2.6; 3: Extrato de Ec contendo o plasmídeo pJlB53. As proteínas superexpressas são indicadas por uma seta. FONTE: A autora (2009).

Para a purificação das proteínas GlnB selvagem e mutantes utilizamos inicialmente um protocolo descrito por Araújo e colaboradores (2008), denominado protocolo 1. As células induzidas foram lisadas por sonicação e aplicadas em coluna Hitrap-heparina de 5 mL acoplado a um sistema de purificação de proteínas AKTA (GE Healthcare). As amostras foram eluídas com um gradiente de KCl em um total de 10 volumes de coluna. A proteína GlnB selvagem foi eluída com 383 mmol/L de KCl, enquanto que as proteínas GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F foram eluídas com 304, 259 e 364 mmol/L de KCl, respectivamente. A Figura 12 apresenta o perfil de migração eletroforética das frações eluídas. As frações foram agrupadas e dialisadas conforme indicado. Com a metodologia empregada obtivemos GlnBY51F purificada nas concentrações de 0,28 µg/µL (fração A) e 4,11 µg/µL (fração B)

(Figura 14) e um rendimento total de 13,2 mg. A proteína GlnB purificada tinha concentração de 6,80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 13) e um rendimento total de 20,4 mg, enquanto que a concentração de GlnBL13P foi 2,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (fração A) e 3,66 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (fração B) (Figura 16) e um rendimento total de 17,5 mg. GlnBV100A também foi purificada e as concentrações das frações A, B e C foram 0,78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 3,66 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,46 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente (Figura 15) tendo sido obtido um rendimento total de 43,6 mg. Estas proteínas foram utilizadas para ensaios de uridililação e posterior análise por espectrometria de massa.

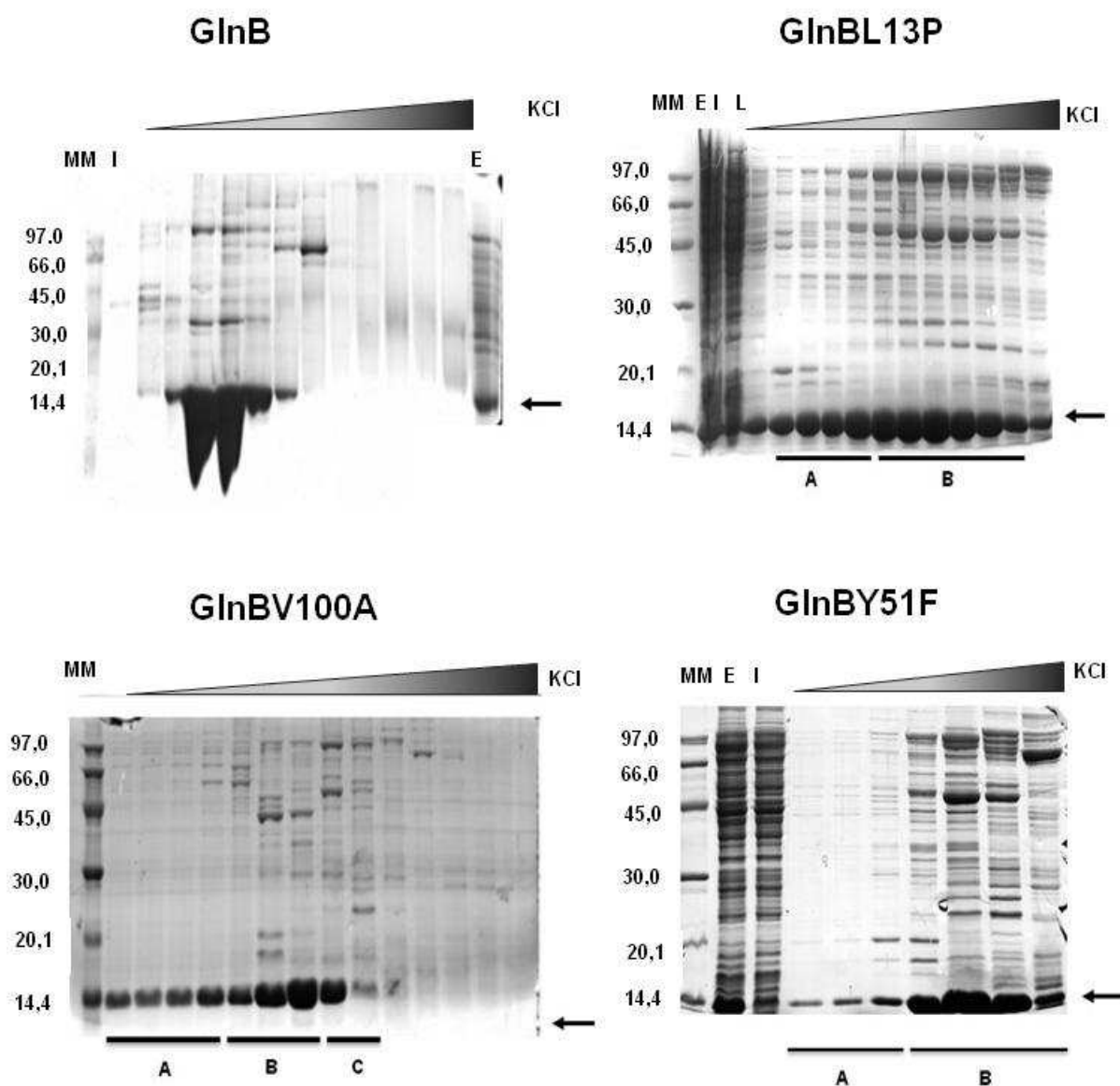


FIGURA 12. PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DURANTE PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnBY51F, GlnBV100A, GlnBL13P E GlnB DE *A. brasilense*. Cinco microlitros das frações eluídas com um gradiente de KCl da coluna Hitrap-heparina foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes (12,5%) e coradas com Coomassie Blue. MM- marcador de massa molecular (KDa) (GE Healthcare); E- extrato bruto da cultura. I: Proteínas não ligantes à coluna, L: fração de lavagem da coluna. As frações foram agrupadas em A, B, C, conforme indicado e dialisadas. As setas indicam as proteína GlnB selvagem e mutantes. FONTE: A autora (2009).

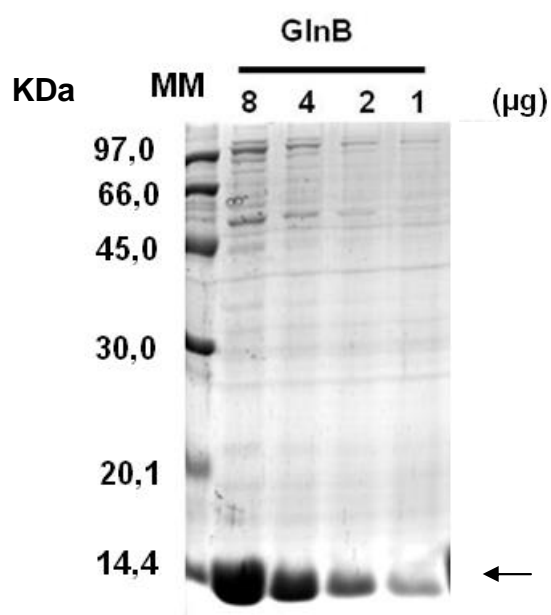


FIGURA 13. PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA GlnB PURIFICADA DE *A. brasilense*. Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) das amostras eluídas em coluna Hitrap-heparina e dialisadas por 12h em tampão (Tris.HCl 50 mmol/L pH7,5, KCl 100 mmol/L e glicerol 20 %). O gel foi corado com Coomassie Blue. A seta indica a proteína GlnB. A concentração total de proteínas aplicada foi 8, 4, 2 e 1 µg. MM: marcador de massa molecular (GE Healthcare). FONTE: A autora (2009).

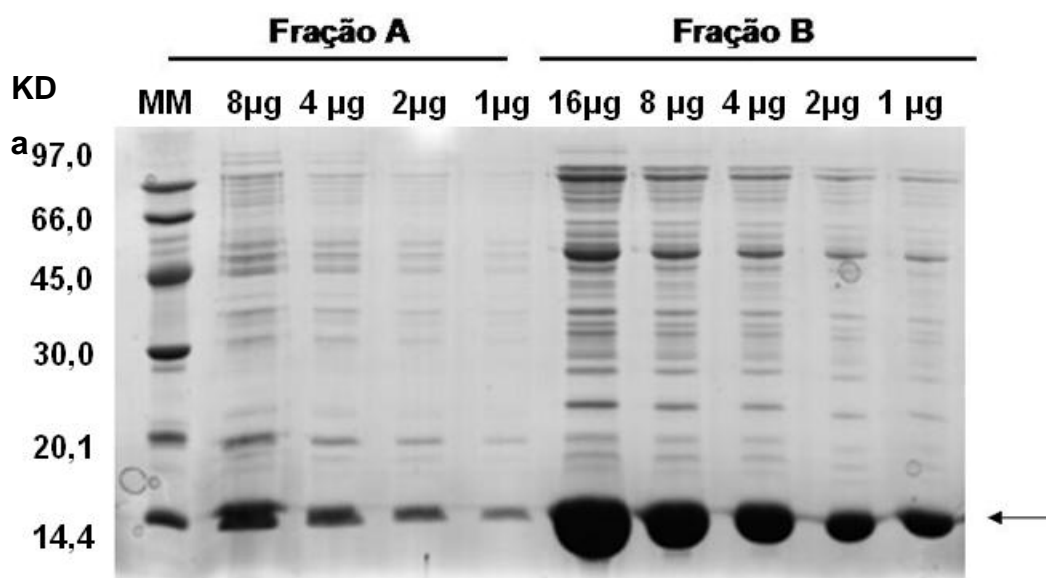


FIGURA 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES AGRUPADAS E DIALISADAS DA PROTEÍNA GlnBY51-F DE *A. brasilense*. Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) das amostras eluídas em coluna Hitrap-heparina e dialisadas por 12h em tampão Tris.HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 100 mmol/L e glicerol 20 %. O gel foi corado com Coomassie Blue. A concentração total de proteína aplicada são apresentadas. A proteína GlnBY51F é indicada por uma seta. MM: marcador de massa molecular (GE Healthcare). FONTE: A autora (2009).

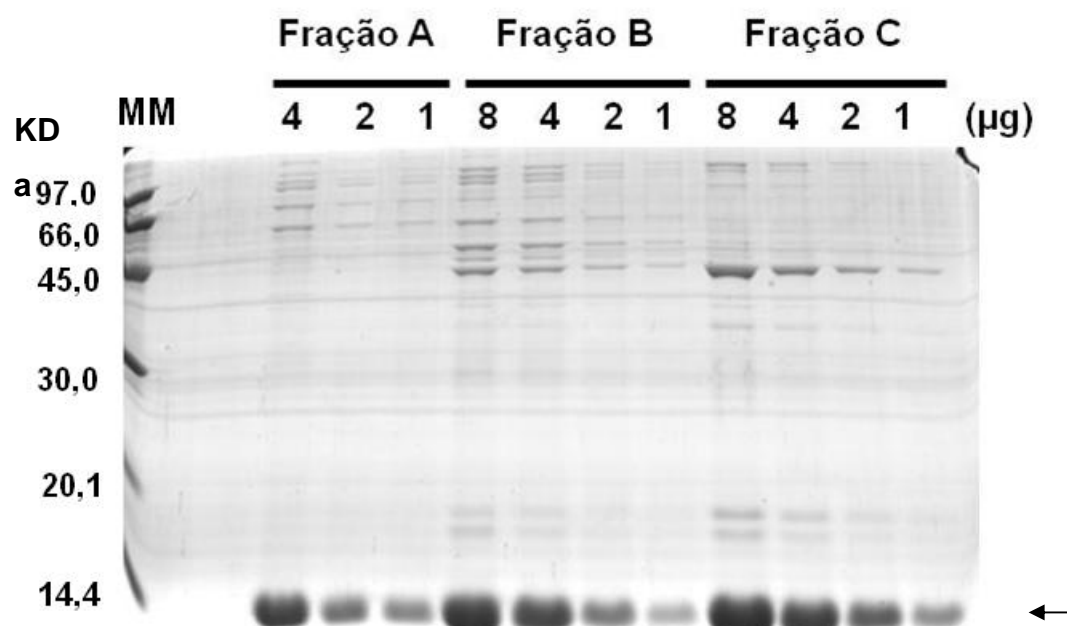


FIGURA 15. PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DIALISADAS OBTIDAS A PARTIR DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnBV100A DE *A. brasilense*. Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) das amostras eluídas em coluna Hitrap-heparina e dialisadas por 12h em tampão (Tris.HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 100 mmol/L e glicerol 20 %). O gel foi corado com Coomassie Blue. A seta indica a proteína GlnBV100A. A concentração total de proteínas aplicada é apresentada. MM: marcador de massa molecular (GE Healthcare). FONTE: A autora (2009).

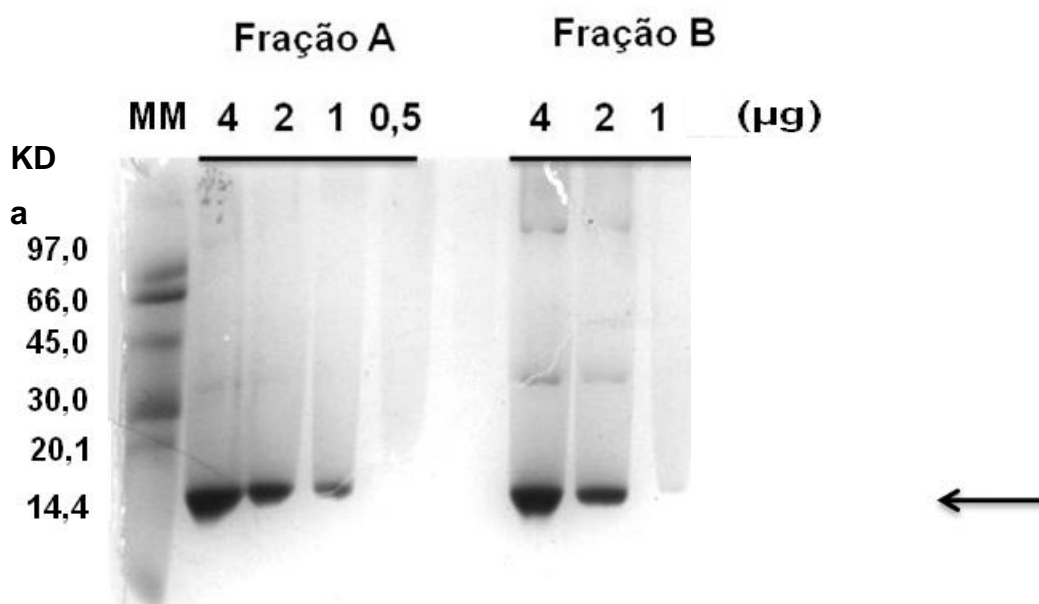


FIGURA 16: PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DE FRAÇÕES AGRUPADAS E DIALISADAS DA PROTEÍNA GlnBL13P DE *A. brasilense*. Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) das amostras eluídas em coluna Hitrap-heparina e dialisadas em tampão (Tris.HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 100 mmol/L e glicerol 20 %) O gel foi corado com Coomassie Blue. A seta indica a proteína GlnBL13P. MM: marcador de massa molecular (GE Healthcare). A concentração total de proteína aplicada foi de 4, 2, 1 e 0,5 µg. FONTE: A autora (2009).

Embora o método de purificação descrito por Araújo (2008) permita a purificação de GlnB em uma única etapa, nas nossas condições não obtivemos um elevado grau de pureza nas preparações obtidas. Na tentativa de aumentar a pureza das preparações das proteínas GlnB selvagem e mutantes, testamos diferentes condições para a indução de GlnB (diferentes temperaturas e tempos de indução). Além disso, avaliamos o uso de um tratamento térmico no extrato celular de *E. coli* induzido como etapa de pré-purificação. O objetivo do tratamento térmico foi promover a desnaturação protéica para a remoção de proteínas termosensíveis. Dessa forma, as proteínas desnaturadas puderam ser removidas por centrifugação. Para determinar as condições de tratamento térmico, culturas de *E. coli* BL21 λ DE3 contendo os plasmídeo pLH25 (que contém o gene *glnB* de *A. brasilense*) foram induzidas com IPTG 0,5 mmol/L em três temperaturas diferentes: (1) 20°C, durante 16h, (2) 30°C ou (3) 37°C, durante 3h. A Figura 17 apresenta o perfil eletroforético dos extratos celulares obtidos. Na linha 2 encontra-se o extrato celular de uma cultura não induzida e, nas linhas 3, 4 e 5, os extratos celulares obtidos por indução a 20, 30 e 37°C, respectivamente. O rendimento de GlnB foi semelhante nas diferentes condições testadas. Estabelecemos que a indução de *glnB* seria realizada a 20°C, durante 16h, para que o processamento e a purificação da amostra ocorressem no mesmo dia. Para determinar as condições do tratamento térmico a ser empregado, alíquotas das culturas de *E. coli* induzidas a 37°C foram submetidas à tratamento térmico a 80°C durante 3 ou 5 minutos ou 100°C durante 3 ou 5 minutos, seguido de centrifugação. Dez microlitros do sobrenadante foram aplicados em gel desnaturante (Figura 17). Os tratamentos térmicos a 80 ou 100°C nos diferentes tempos não apresentaram diferenças substanciais de eficiência, de modo que optamos pelo tratamento mais brando (80°C durante 3 minutos), como etapa de pré-purificação.

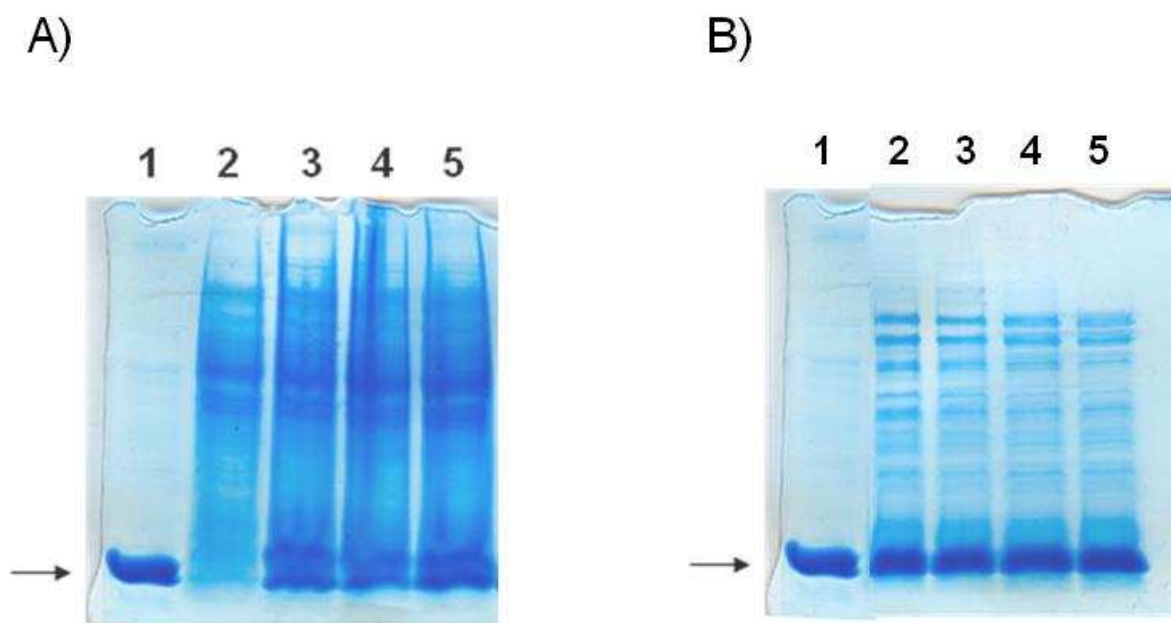


FIGURA 17. TESTE DE INDUÇÃO DE EXPRESSÃO DE GlnB E EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NA ÉTAPA DE PRÉ-PURIFICAÇÃO DE GlnB. *E.coli* BL21 (λ DE3) contendo o plasmídeo pLH25. (A) Os extratos celulares foram preparados após crescimento em meio LB contendo canamicina 50 μ g/mL sem adição de IPTG (2) ou pela indução de 0,5 mmol/L de IPTG, durante 16h e 20°C (3), 3h e 30°C (4), 3h e 37°C (5). Dez microlitros da cultura foram misturados à 17 μ L de tampão de corrida, fervidos por 1 min, centrifugados e aplicados (10 μ L) em gel SDS-PAGE 12,5%. (B) Um extrato celular da cultura induzida com 0,5 mmol/L de IPTG 3h a 37°C foi lisado por sonicação e tratado à 80°C por 3 minutos (6), 80°C por 5 minutos (7), 100°C por 3 minutos (8), 100°C por 5 minutos (9). Na linha 1 encontra-se como controle a proteína GlnK de *E.coli* purificada (5 μ g, 12,2 KDa). FONTE: A autora (2009).

Para evitar que ocorressem perdas de GlnB durante a injeção do extrato celular na coluna de heparina, a concentração de sal no tampão de purificação foi reduzida de 100 para 50 mmol/L de KCl e substituímos o EDTA pelo uso de um coquetel inibidor de protease livre de EDTA (Roche). A expressão das proteínas foi induzida por 0,5 mmol/L de IPTG durante 16h, na presença de 30 mmol/L de NH_4Cl e as células mantidas em gelo durante 1h após esse período. A cultura foi centrifugada e as células lisadas em prensa francesa (3 vezes) e submetidas ao tratamento térmico (80°C/ 3 min). A fração solúvel do extrato celular foi aplicado em coluna de HiTrap-heparina (5mL) e as proteínas foram eluídas com um gradiente de 50 a 600 mmol/L de KCl em 10 volumes de coluna e fluxo de 1mL/min (protocolo 2). A proteína GlnB foi eluída com 354 mmol/L de KCl. A Figura 18 (A) mostra o perfil de migração eletroforético das frações eluídas. Não houve perda de GlnB durante a injeção da amostra nem no processo de lavagem da coluna. As frações 15-22 foram selecionadas e a concentração de proteína determinada. A Figura 18 (B) apresenta o perfil eletroforético das frações mais puras de GlnB (5µg de proteína) e, em (C), a concentração protéica das frações obtidas são apresentadas. A metodologia empregada para a expressão e purificação de GlnB em apenas um passo cromatográfico permitiu a obtenção de frações de concentrações elevadas (até 18,99 mg/mL) e de alta pureza (97%), em um total de 59,7 mg de proteína. As proteínas purificadas utilizando o protocolo 2 foram utilizadas para os experimentos de microcalorimetria.

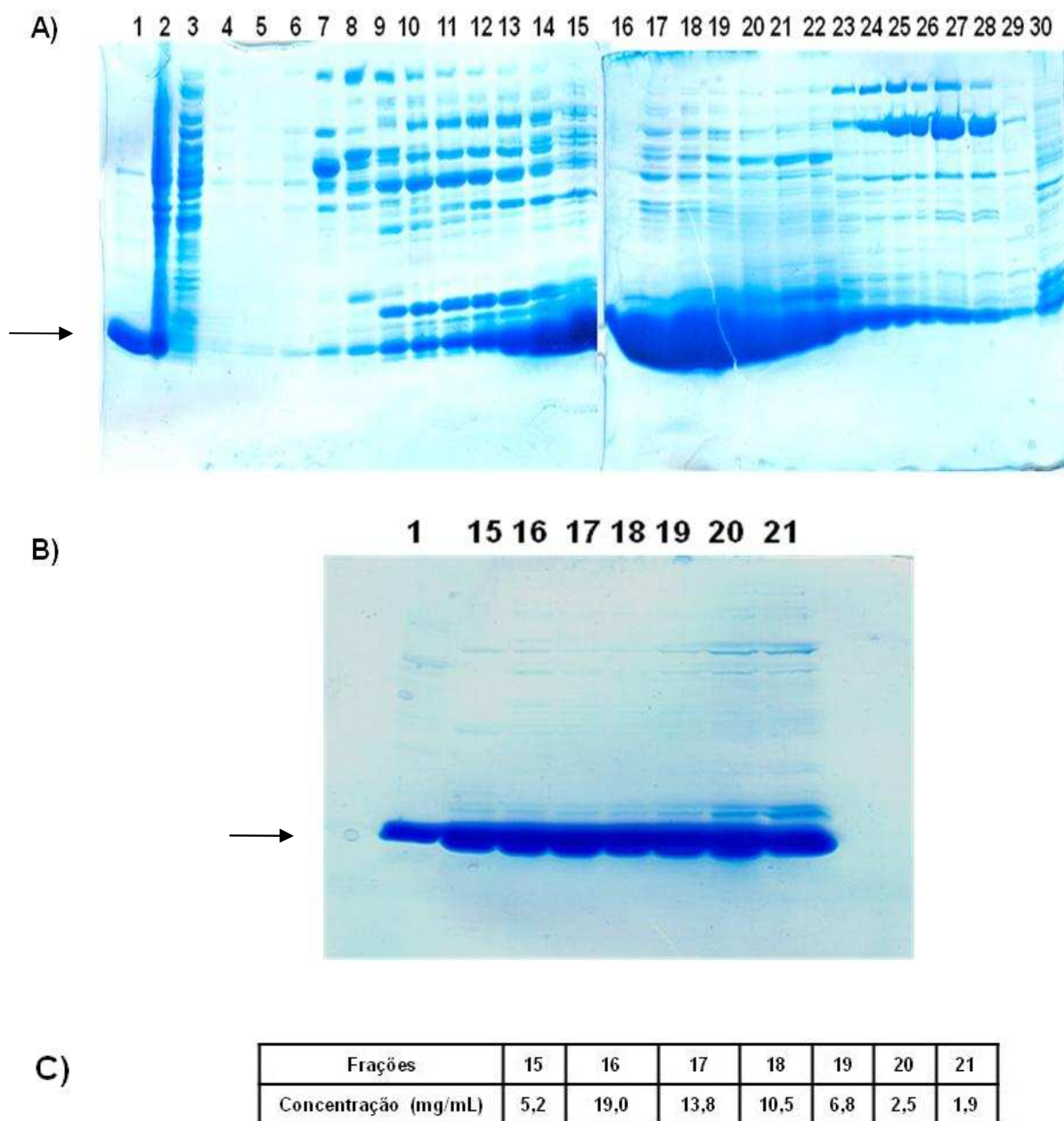


FIGURA 18. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense*. (A) Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) das amostras eluídas (10 μ L de amostra) em coluna Hitrap-heparina (5mL), onde: 1 e 16- *E. coli* GlnK purificada (controle), 2- Extrato bruto, 3- Injeção, 4-lavagem, 5-30-frações eluídas pelo gradiente de KCl. (B) Eletroforese SDS-PAGE 12,5% de alíquotas (5 μ g) das frações 15-21 da preparação de GlnB, coradas com Coomassie Blue. 1: Proteína GlnK de *E. coli* (controle, 3 μ g). As proteínas PII são indicadas por uma seta. (C) Concentração protéica das frações obtidas na purificação de GlnB. FONTE: A autora (2009).

Para verificar se o processo de desnaturação/renaturação de GlnB não gerou alterações nas características estruturais de GlnB, as proteínas purificadas com tratamento térmico foram analisadas por eletroforese não desnaturante e comparadas à migração das proteínas purificadas sem tratamento térmico. A Figura 19 mostra o perfil eletroforético em gel nativo das proteínas purificadas, e sugere que o tratamento térmico não modificou a estrutura de GlnB, uma vez que esta proteína apresentou migração idêntica ao da proteína GlnB purificada sem a utilização do tratamento térmico. O resultado sugere que a estrutura trimérica de GlnB foi mantida após a purificação utilizando este tratamento. As proteínas purificadas também foram submetidas a uma reação de uridililação por GlnD e a porcentagem de uridililação das mesmas em função do tempo foi analisada em gel não desnaturante. A Figura 20 apresenta o perfil eletroforético do produto da reação de uridililação das proteínas GlnB purificadas com ou sem tratamento térmico. A uridililação da proteína purificada com o tratamento térmico foi idêntica a da GlnB purificada sem o aquecimento, indicando, novamente, que as características estruturais de GlnB foram mantidas após o tratamento térmico.

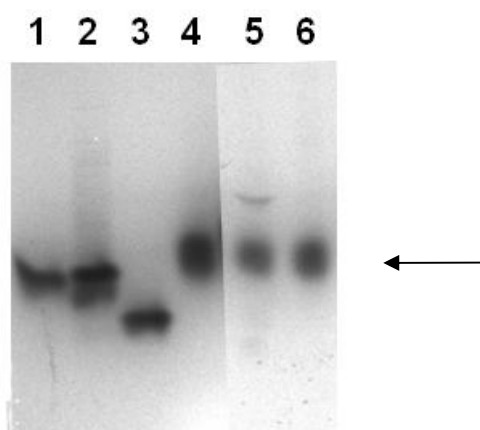


FIGURA 19. PERFIL DE MIGRAÇÃO EM GEL NATIVO DAS PROTEÍNAS GlnB DE *A. brasilense* PURIFICADAS. Cinco microgramas das proteínas purificadas foram misturadas ao tampão de corrida e submetidas à eletroforese nativa. O gel foi corado com Coomassie Blue. As proteínas GlnB *H. seropedicae* (H.s.) (linha 1); GlnK H.s. (2); GlnB-UMP H.s. (3); GlnB A.b (controle) (4); GlnB purificada sem tratamento térmico (5) e GlnB submetida a tratamento térmico (6) são destacadas no gel (→). FONTE: A autora (2009).

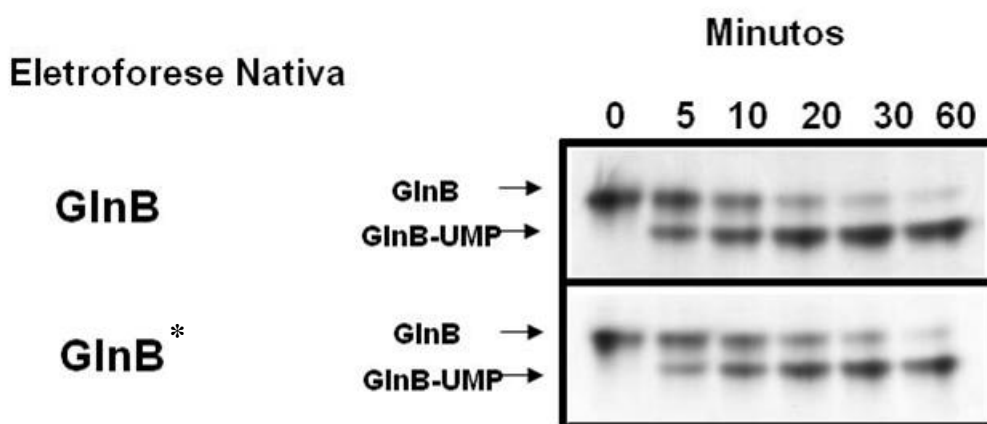


FIGURA 20. COMPARAÇÃO DO PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB PURIFICADAS COM OU SEM TRATAMENTO TÉRMICO. Perfil de uridililação das proteínas GlnB e GlnB* (tratada termicamente). O sistema de reação continha as proteínas purificadas (10 $\mu\text{mol/L}$), ATP (0,1 mmol/L), 2- oxoglutarato (2 mmol/L), UTP (1 mmol/L) e GlnD (200 nmol/L). A reação foi interrompida nos tempos 0, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos e submetidas à eletroforese não desnaturante (10%) e o gel corado com Coomassie Blue. FONTE: A autora (2009).

A proteína GlnBV100A também foi purificada através do protocolo 2. Entretanto, não foi obtida com a mesma pureza. Para melhorarmos as preparações, as frações de maior pureza e de maior concentração foram agrupadas, dialisadas em tampão Tris.HCl 50 mmol/L e KCl 50 mmol/L pH7,5 e novamente aplicadas em coluna Hitrap-heparina (5 mL). O perfil eletroforético das frações eluídas na segunda etapa está apresentado na figura 21 (A). A proteína GlnBV100A eluiu com 240 mmol/L de KCl e tinha concentração de até 5,23 mg/mL e um rendimento total de 76 mg .

A purificação da proteína GlnBL13P seguiu os mesmos passos utilizados para a purificação de GlnB. Entretanto, a ligação desta proteína à coluna Hitrap-heparina foi menos eficiente quando compara à GlnB. Por isso, as frações obtidas apresentaram concentrações menores do que aquelas obtidas nas primeiras etapas das outras purificações. A figura 21 (B) mostra o perfil eletroforético das frações eluídas. Foram obtidas frações de até 4,1 mg/mL , e o rendimento total obtido foi de 52 mg de proteína

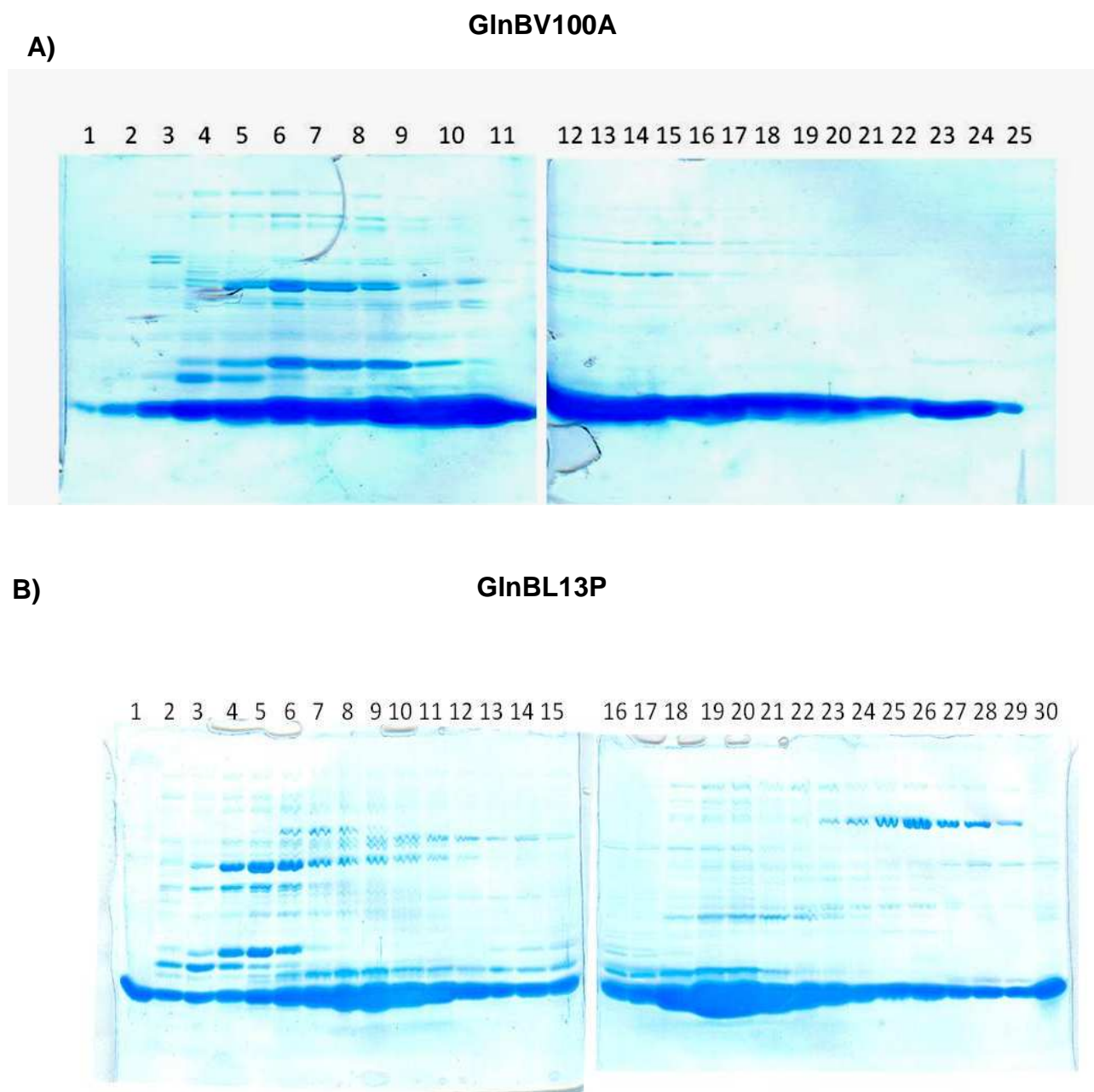
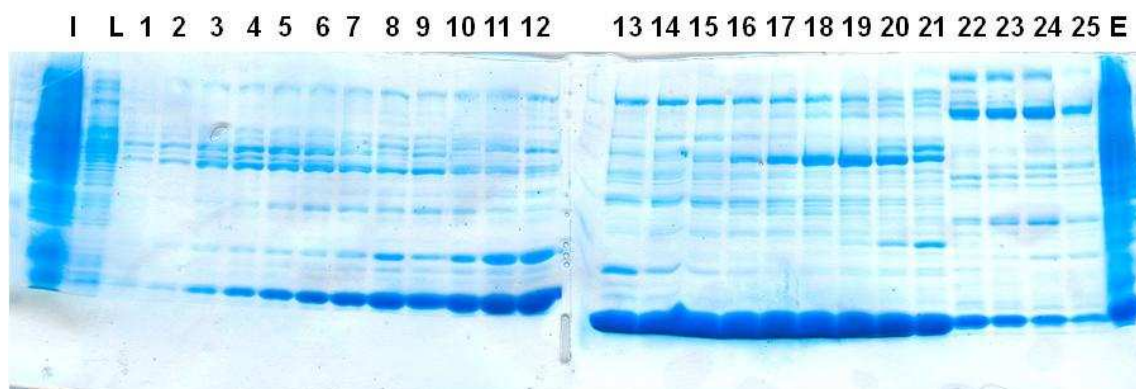


FIGURA 21. PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnBV100A e GlnBL13P DE *A. brasiliense*. Frações da purificação das proteínas GlnBV100A (A) e GlnBL13P (B) em coluna Hitrap heparina (5mL) foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12,5% (5 μ L de amostra). Onde: linhas: 1 e 30: proteína GlnK de *E. coli* purificada (controle, 12,4 KDa, 5 μ g), linhas 2-29: frações eluídas na purificação. FONTE: A autora (2009).

A proteína GlnBY51F também foi purificada pelo protocolo 2 e o perfil eletroforético das frações obtidas está apresentado na Figura 22 (A). A proteína GlnBY51F foi eluída com 320 mol/L de KCl. Novamente, as frações obtidas não apresentaram elevada pureza, de modo que as frações de maior concentração foram agrupadas e submetidas a um novo tratamento térmico a 80°C, durante 3 minutos, seguido de centrifugação para a remoção das proteínas desnaturadas. A concentração final da proteína GlnBY51F foi 4,20 mg/mL e um rendimento total de 67,2 mg de proteína. A proteína purificada é apresentada na Figura 22, B.

As proteínas purificadas foram utilizadas nos ensaios de uridililação e espectrometria de massa, além de ensaios de ligação de efetores por microcalorimetria.

A)



B)



FIGURA 22. PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO DA PROTEÍNA GlnBY51F DE *A. brasilense*. (A) Frações da purificação de GlnBY51F em coluna Hitrap heparina (5 mL) foram coletadas e analisadas (5 μ L) por SDS-PAGE (12,5%) e coradas com Coomassie blue. Linha I: proteínas não ligantes à coluna, L: proteínas eluídas na lavagem da coluna. Linhas 1 e 30: proteína GlnK de *E. coli* purificada (controle), linhas: 2-25-frações eluídas. B) Eletroforese das proteínas GlnBY51F (indicada por uma seta) purificadas antes (2) e após (1) novo tratamento térmico (80°C por 3 min), coradas com Coomassie blue. MM: marcador de massa molecular (GE Healthcare). FONTE: A autora (2009).

5.3 Perfil de migração das proteínas GlnB, GlnBL13P, GlnBV100A, GlnBY51F em gel não desnaturante

As proteínas do tipo PII são encontradas como trímeros em solução. Alguns resíduos das proteínas PII, por exemplo Val30, Glu32, Lys34, Val93, Glu95 e Arg98 da proteína GlnK de *E. coli*, são conhecidos por participarem de ligações que estabilizam a estrutura quaternária de PII (XU *et al.*, 1998; ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). Com o objetivo de avaliar se os resíduos L13, V100 e Y51 participam da estabilização da estrutura trimérica de GlnB em *A. brasilense*, as proteínas GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F foram purificadas e o seu perfil de migração em gel nativo foi comparado ao perfil obtido pela migração da proteína GlnB selvagem purificada.

Cinco microgramas de proteínas purificadas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante. A Figura 23 apresenta o perfil eletroforético obtido. Como controle de migração foram utilizadas as proteínas GlnB, GlnK e GlnB-UMP de *Herbaspirillum seropedicae* que apresentam estrutura trimérica com massa de 36 KDa. O perfil de migração das proteínas GlnBY51F e GlnBV100A foi semelhante aquele obtido para de GlnB, indicando que estas proteínas, apresentam estrutura trimérica, e que as substituições criadas não levaram à alteração substancial na estrutura de GlnB. Entretanto, o perfil de migração da proteína GlnBL13P foi significativamente diferente daquele obtido para de GlnB. O resultado indica que a substituição L13P provavelmente causou uma alteração significativa de sua estrutura. Essa alteração conformacional pode ter sido responsável pela incapacidade da proteína GlnBL13P de restaurar o fenótipo Nif⁻ da estirpe LFH3 (INABA, 3005) .

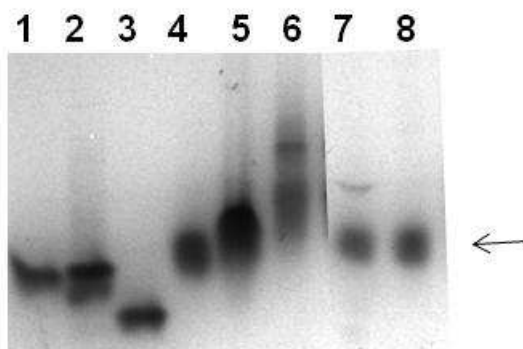


FIGURA 23. PERFIL DE MIGRAÇÃO EM GEL NATIVO DAS PROTEÍNAS GlnB DE *A. brasilense* E DE SUAS MUTANTES GlnBL13P, GlnBV100A E GlnBY51F. Cinco microgramas das proteínas GlnBY51F, GlnBL13P, GlnBV100A e GlnB purificadas foram misturadas ao tampão de corrida e submetidas à eletroforese nativa. O gel foi corado com Coomassie Blue. 1) GlnB de *H. seropedicae* (H.s.); 2) GlnK H.s.; 3) GlnB-UMP H.s.; 4) GlnB *A. brasilense* (controle); 5) GlnBY51F; 6) GlnBL13P; 7) GlnBV100A; 8) GlnB . As proteínas PII são indicadas no gel (→). FONTE: A autora (2009).

5.4 Estudo da uridililação da proteína GlnB de *A. brasilense*

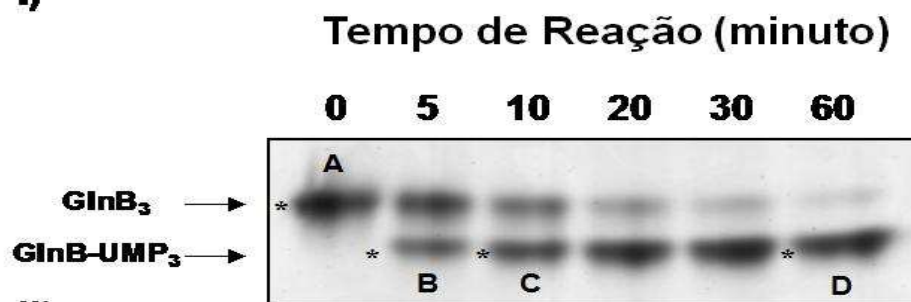
A maioria das proteínas do tipo PII pode ser uridililada no resíduo Tyr51, que é altamente conservado. Essa reação é catalisada pela proteína GlnD (ARCONDEGUY, JACK e MERRICK, 2001). Quando as proteínas do tipo PII sofrem reação de uridililação e são separadas em gel nativo, pode-se evidenciar a formação de 4 bandas distintas, uma vez que a adição de resíduos UMP à PII aumenta sua taxa de migração. Desta maneira, as formas livre, mono-, di- e tri-uridililada podem ser resolvidas em gel nativo (FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC, 1994).

As formas não modificada, total e parcialmente uridililadas das proteínas GlnZ (ou sua ortóloga GlnK) de *A. brasilense*, *H. seropedice* e *E. coli* podem ser obtidas *in vivo* e *in vitro* (FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC, 1994; BONATTO *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2008). Por outro lado, quando o perfil de uridililação da proteína GlnB de *A. brasilense* foi avaliado, foram observadas somente duas bandas que pareciam corresponder ao trímero não modificado ou completamente uridililado (ARAUJO *et al.*, 2008). Este comportamento ainda não foi encontrado em nenhuma proteína do tipo PII (HUERGO *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2008). Para confirmar que as duas bandas não continham trímeros híbridos, amostras de GlnB antes e depois da reação de uridililação foram coletadas e submetidas à análise por

espectrometria de massa MALDI-TOF que revelou a presença somente das formas não modificada e uridililada desta proteína. Esse resultado levou à sugestão de que a ausência das bandas intermediárias de uridililação não ocorreu devido à falta de resolução destas formas na eletroforese nativa, e sim porque somente as formas não modificada ou totalmente uridililadas de GlnB foram encontradas. Com esse resultado, os autores sugeriram que ou as proteínas GlnB seriam uridililadas de forma cooperativa, onde a reação ocorreria em uma velocidade alta o suficiente para que formas intermediárias não fossem evidenciadas, ou que a formação de trímeros híbridos não fosse estável em solução, ocorrendo um rearranjo entre as formas favorecendo a formação de homotrímeros (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Na tentativa de caracterizar melhor a uridililação em GlnB de *A. brasilense*, analisamos as bandas extraídas de géis nativos de reações de uridililação incompleta da proteína GlnB de *A. brasilense*. A Figura 24 (I) apresenta uma curva de tempo de uma reação de uridililação da proteína GlnB por GlnD (200 nmol/L) de *A. brasilense*. Novamente, não foram encontradas bandas referentes às formas parcialmente uridililadas (GlnB-UMP₁ e GlnB-UMP₂). As bandas correspondentes aos tempos 0 (A), 5 (B), 10 (C) e 60 (D) minutos foram retiradas do gel desnaturante, digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF para investigar a presença das formas intermediárias de uridililação que poderiam estar não sendo separadas pela eletroforese. Os espectros de massa gerados estão apresentados na Figura 24 (II). Um pico com relação massa/carga de 1237,977 foi obtido após digestão da banda do tempo zero de reação que correspondeu à forma não uridililada de GlnB (Figura 24, IA, e IIA). Esse pico corresponde ao fragmento de digestão triptica de GlnB cuja massa teórica foi 1237,646 e que contém os resíduos 48-58 (GAEYVVDLFPK) e sítio de uridililação desta proteína (Y51). Nos tempos 5, 10 e 60 minutos, os picos referentes a esse fragmento não foi mais encontrado, mas foi substituído por um pico que apresentou uma relação massa/carga de 1543,852, que corresponde ao mesmo fragmento obtido anteriormente, acrescido de um resíduo UMP (diferença de massa de 306 Da). Esse resultado confirma os dados obtidos por Huergo e Araujo (HUERGO *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2008) e mostram que para a proteína GlnB de *A. brasilense* as formas mono- e di-uridililadas não são encontradas, estando presentes somente as formas não modificada ou totalmente uridililada.

I)



II)

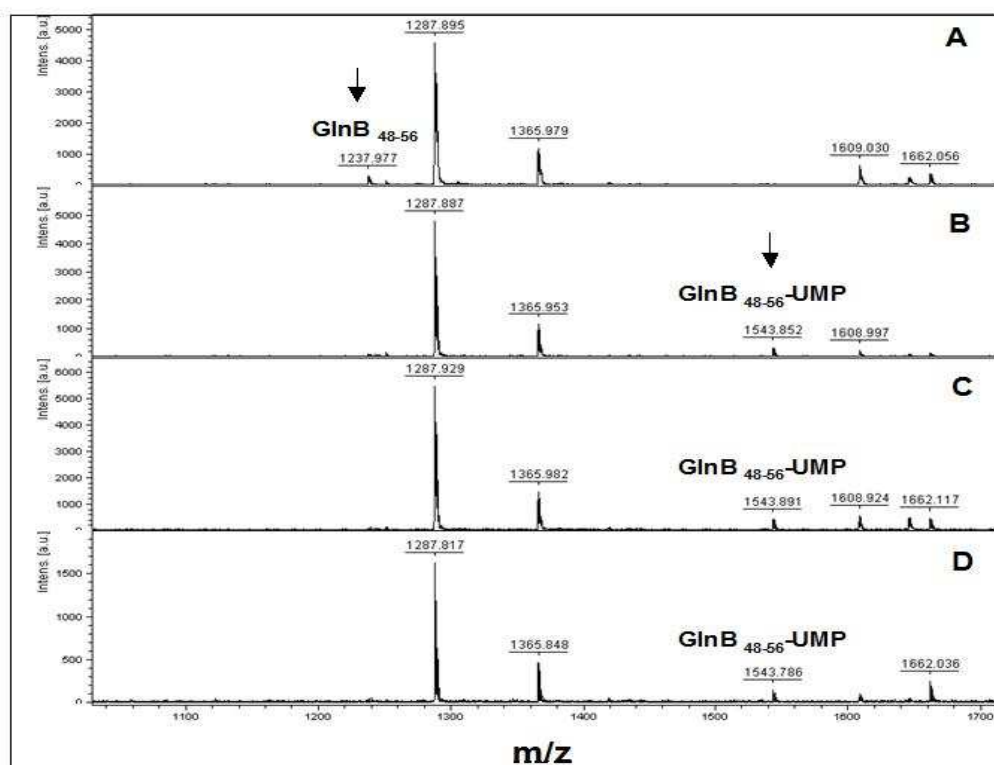


FIGURA 24. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF DO PRODUTO DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense*. O sistema de reação continha ATP (100 $\mu\text{mol/L}$), 2-oxoglutarato (2 mmol/L), UTP (1 mmol/L), GlnB (10 $\mu\text{mol/L}$) e GlnD (200 nmol/L). A reação foi parada nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 60 minutos, e analisadas por eletroforese em gel não desnaturante (I). As bandas A-D foram retiradas do gel, digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Os espectros de massa obtidos foram analisados pelos programas FlexAnalysis 2.0 e Mascot II) Espectro das amostras A-D que correspondem ao produto de digestão trípica das bandas *A, *B, *C and *D em (I). As setas indicam os peptídeos GlnB₄₈₋₅₆- não uridililados e uridililados que contém os resíduos 48-56 de GlnB (m/z diferença de 306). Os picos m/z 1287,8950 correspondem aos resíduos 91-101 de GlnB; 1365,9790 corresponde aos residues 73-85 e 1646,0780 aos resíduos 59-72. Os espectros foram obtidos utilizando uma relação sinal/ruído de 6. FONTE: A autora (2009).

5.5 Estudo da formação de trímeros híbridos entre as proteínas do tipo PII de *A. brasilense*

A formação de trímeros não modificado, mono, di e tri-uridililado de proteínas do tipo PII já foi descrita em *E. coli*, *H. seropedicae* e para a proteína GlnZ de *A. brasilense* (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 1997; BONATTO *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008). Além da formação destes trímeros híbridos, as proteínas do tipo PII podem formar heterotrímeros com as suas parálogas: GlnK ou GlnB (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). A formação de heterotrímeros foi descrita em *E. coli* e parece ser importante para um ajuste fino da atividade de proteínas do tipo PII no controle da atividade de proteínas alvo, como GS e NtrB (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000).

A confirmação de que as proteínas GlnB de *A. brasilense* não são capazes de formar trímeros híbridos mono e di uridililados deu suporte à hipótese de que ou as subunidades de GlnB são uridililadas de forma cooperativa e rápida, de forma a não serem encontradas formas intermediárias ou que as formas parcialmente uridililadas não seriam estáveis em solução, favorecendo a formação de homotrímeros (ARAÚJO *et al.*, 2008). Com o objetivo de avaliar a estabilidade de trímeros híbridos entre proteínas PII de *A. brasilense*, as proteínas GlnB, GlnZ, GlnB-UMP₃ e GlnZ-UMP₃ purificadas foram submetidas à uma reação de desnaturação e renaturação (item 4.21) e separadas em eletroforese não desnaturante. Estudos envolvendo desnaturação e renaturação de GlnB e GlnK já foram descritos em *E. coli* (JIANG *et al.*, 1997; VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). Estes autores empregaram uréia como agente desnaturante, que embora tenha sido eficiente em promover a desnaturação e renaturação das proteínas PII após sua remoção, ele alterou a atividade de GlnB e GlnK no controle de GlnE (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). Com objetivo de evitar a perda da atividade da proteína, empregamos um tratamento térmico como agente desnaturante. As proteínas PII são desnaturadas após fervura durante 5 minutos, desestabilizando os trímeros em solução e permitindo que novas interações sejam geradas após resfriamento do sistema. A proteína GlnB de *A. brasilense* tratada termicamente foi uridililada da mesma forma que GlnB (item 5.2) e o tratamento à 100°C não levou à perda de UMP de PII (Figura 21).

Sob temperatura ambiente, as proteínas GlnZ e GlnZ-UMP foram encontradas como bandas homogêneas na eletroforese não desnaturante (Figura 25, A) Quando

ambas as proteínas foram misturadas (1:1) e mantidas à temperatura ambiente, não foram observadas a presença das formas híbridas mono- ou di- uridililadas. Somente bandas homogêneas referentes aos homotrímeros totalmente livre ou totalmente uridililados foram encontradas, conforme o esperado. Quando as proteínas GlnZ e GlnZ-UMP foram fervidas durante 5 minutos e mantidas em gelo (para permitir a renaturação protéica) novos oligômeros mono- e di-uridililados foram evidenciados na eletroforese não desnaturante. Esse resultado era esperado, dado que o tratamento térmico promove rompimento das estruturas quaternárias de GlnZ e GlnZ-UMP₃ que, após resfriamento das amostras, podem se reagrupar aleatoriamente, levando à formação de trímeros contendo 0, 1, 2 ou 3 monômeros uridililados. A afinidade entre um monômero não uridililado com um uridililado foi semelhante, uma vez que as formas predominantes encontradas foram a mono- e di-uridililada.

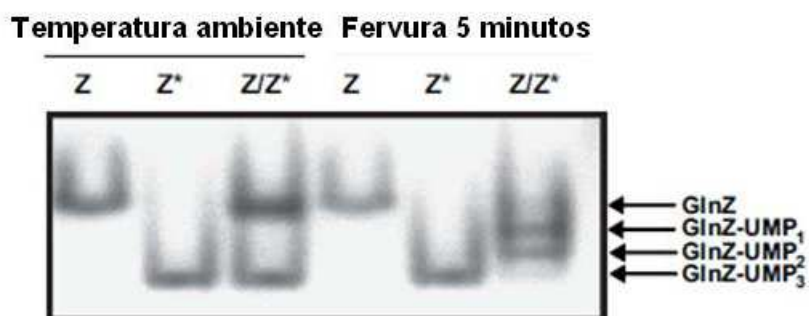
Quando as proteínas GlnB e GlnB-UMP purificadas foram misturadas, fervidas e renaturadas à baixa temperatura, as formas mono- e di-uridililadas não foram encontradas. Somente duas bandas que correspondem as formas livre e totalmente uridililada de GlnB foram encontradas (Figura 25 B, linhas 3 e 9). Este resultado sugere que um dos fatores pelos quais a proteína GlnB não seja encontrada como um trímero híbrido seja devido à sua falta de estabilidade em solução.

Para avaliar se as proteínas do tipo PII de *A. brasilense* eram capazes de formar heterotrímeros entre si, as proteínas GlnB e GlnZ, GlnB e GlnZ-UMP₃, GlnZ e GlnB-UMP₃ foram misturadas e submetidas ao tratamento de desnaturação/renaturação térmica e aplicadas em eletroforese não desnaturante (Figura 25 B, linhas 6, 7 e 8, respectivamente). Após esse tratamento não foi evidenciada a presença de estruturas híbridas em nenhuma das condições testadas. Esse resultado sugere que, diferentemente do que ocorre em *E. coli*, em *A. brasilense* as proteínas do tipo PII não são capazes de formar heterotrímeros *in vitro*.

Estudos em *E. coli* envolvendo mutantes GlnB Δ 47-53, região da alça-T, sítio de uridililação de GlnB, mostraram que GlnB é encontrada como híbrido mono-, di- e tri-uridililado e que a presença de somente uma alça T na estrutura trimérica é suficiente para promover a interação de GlnB com seus receptores. Os trímeros híbridos foram capazes de regular a atividade de NtrB, promovendo a defosforilação

de NtrC, além do controle da atividade de GS por GlnE (JIANG *et al.*, 1997). Van Heeswijk e colaboradores (2000) mostraram que os heterotrímeros de GlnB/GlnK de *E. coli* apresentaram atividades intermediárias comparadas aos homotrímeros de PII, e que este efeito parece ser importante para a modulação da atividade de proteínas do tipo PII. Dado que em *E. coli* estas proteínas apresentam funções que se sobrepõem, como controle de NtrB, GlnE e AmtB, foi sugerido que o papel destas proteínas nestes sistemas seja controlado pela expressão e acúmulo destas proteínas no meio intracelular (ATKINSON *et al.*, 2002). Em *A. brasilense*, apesar das proteínas PII apresentarem 81% de similaridade, estas proteínas apresentam papéis distintos e uma é incapaz de substituir a outra (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998), o que pode justificar o fato de neste organismo não ocorrer a formação de heterotrímeros.

A)



B)

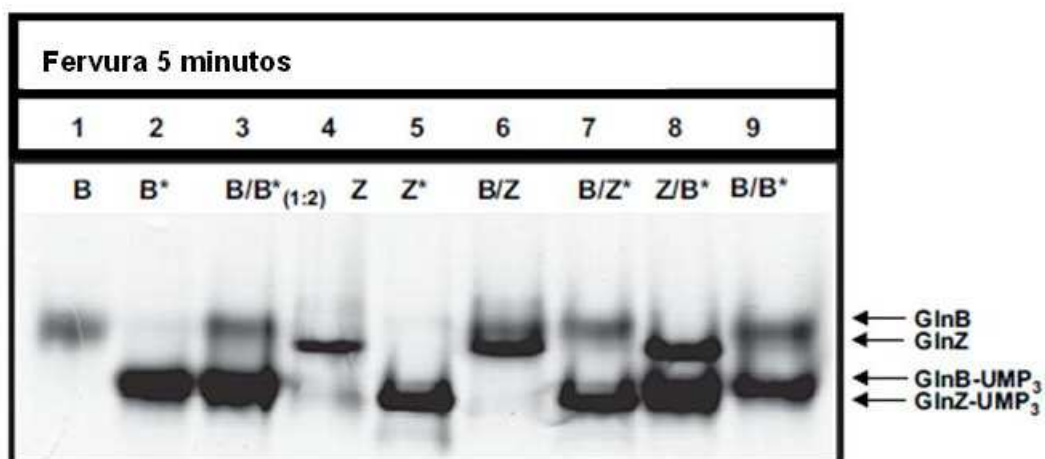


FIGURA 25. AS PROTEÍNAS GlnB E GlnZ *A. brasilense* NÃO FORMAM TRÍMEROS HÍBRIDOS. As proteínas purificadas (concentração final 0,5 mg/ml) foram misturadas na proporção de 1:1 (ou 1:2, quando indicado) e separadas por eletroforese não desnaturante (10%). Quando indicado, as amostras foram fervidas durante 5 minutos e mantidas em gelo até sua aplicação no gel de eletroforese. Os símbolos indicam: B: proteína GlnB de *A. brasilense* (Ab); B*: Ab GlnB-UMP₃; Z: Ab GlnZ; Z*: Ab GlnZ-UMP₃. FONTE: A autora (2009).

5.6 Perfil de uridililação das proteínas mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de *A. brasilense*.

Com o objetivo de caracterizar os efeitos das mutações introduzidas em *glnB*, o perfil de uridililação das proteínas GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F pela proteína GlnD foi avaliado. Para isso, 10 µg de proteínas purificadas foram incubadas em um sistema de reação contendo GlnD (200 nmol/L), 0,1 mmol/L de ATP, 2 mmol/L de 2-oxoglutarato e 1 mmol/L de UTP. As reações de uridililação foram paradas pela adição de EDTA (25 mmol/L) e tampão de corrida nos tempos 0, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese não desnaturante. A Figura 26 apresenta o perfil eletroforético das amostras coletadas. No tempo zero de reação uma banda correspondente à proteína GlnB não modificada foi encontrada. No tempo 5 minutos, duas bandas foram encontradas, que correspondem às proteínas GlnB não modificada e uridililada. A análise densitométrica das bandas obtidas mostrou que 30% da proteína GlnB encontrava-se na forma uridililada no tempo 5 minutos de reação. Após 10 minutos, 63% da proteína foi encontrada na forma uridililada, chegando a 84% de uridililação após 20 minutos, 89% após 30 minutos e 91 % após 60 minutos de reação.

A análise do produto da reação de uridililação da proteína GlnBY51F revelou somente uma banda homogênea, correspondente à forma não uridililada de GlnB. Esse resultado mostra que GlnBY51F não é capaz de ser uridililada por GlnD. O resíduo tirosina 51 é o sítio de uridililação nas proteínas PII dos organismos que sofrem esse tipo de modificação e esse resultado indica que o mesmo ocorre no caso da proteína GlnB de *A. brasilense*.

A proteína GlnBL13P apresentou um perfil de migração em gel nativo atípico quando comparado à GlnB, o que prejudicou a identificação das bandas referentes às formas não modificadas e uridililadas desta proteína. Entretanto, nenhuma modificação de padrão eletroforético foi notada ao longo da reação, o que sugere que não ocorreu a uridililação desta proteína mutante. De forma diferente, a proteína GlnBV100A foi uridililada por GlnD, embora a uridililação aparente tenha sido menor do que a da proteína GlnB. Três por cento da proteína GlnBV100A foi uridililada após 5 minutos de reação. Após 10 minutos de reação, apenas cerca de 5% da proteína apresentou-se modificada, sendo que mesmo após 60 minutos de reação somente 23% de GlnBV100A foi encontrada na forma uridililada. O resultado sugere

que a alteração do resíduo V100 para A levou a uma mudança conformacional na proteína GlnB que desfavorece sua uridililação. Na proteína GlnK de *E. coli* o resíduo, arginina 101, adjacente à valina 100, está envolvido estabilização de uma molécula de ATP (XU *et al.*, 1998). A substituição V100-A, pode ter alterado a afinidade de ATP à GlnB ou mesmo a topologia da proteína ligada ao ATP, causando alteração da uridililação nesta proteína.

O perfil de uridililação das proteínas selvagem e mutantes também foi analisado por espectrometria de massa MALDI-TOF em modo linear. A Figura 27 mostra os espectros de massa obtidos do produto de reação das proteínas GlnB (A), GlnBL13P (B), GlnBV100A (C) e GlnBY51F (D) após zero, trinta e sessenta minutos de reação. Foi identificada a presença de um sinal de relação m/z 12367.977 no tempo zero de reação, que corresponde a massa da proteína GlnB não modificada (A). Esse sinal também foi encontrado nos tempos zero das proteínas GlnBL13P (B), GlnBV100A (C) e GlnBY51F (D). Após 30 minutos de reação, GlnB apresentou o sinal de relação m/z 12367,977 além de um outro sinal de m/z 12674.099 que corresponde à diferença de massa gerada pela adição de um grupamento UMP à proteína GlnB (A). Entretanto, nos tempos 30 minutos das reações de uridililação de GlnBL13-P (B), GlnBV100A (C) e GlnBY51F (D) somente um sinal referente à proteína não modificada foi encontrado, indicando que neste tempo de reação nenhuma das proteínas foi encontrada na forma uridililada. Após 60 minutos de reação, um pico correspondente à forma uridililada de GlnB foi encontrado na uridililação de GlnBV100A, mas não em GlnBL13P nem em GlnBY51F, confirmando que somente GlnBV100A manteve-se capaz de ser uridililada por GlnD.

A falta de uridililação das proteínas GlnBL13P e GlnBY51F, que sinalizaria baixos níveis de nitrogênio, explicaria o porquê destas proteínas não serem capazes de restaurar o fenótipo *Nif⁻ in vivo* da estirpe mutante *glnB⁻*, uma vez que a forma uridililada de GlnB a responsável pela ativação de NifA e, portanto, de transcrição dos genes *nif*. Embora a proteína GlnBV100A tenha sido uridililada, esse processo foi extremamente lento, quando comparado à uridililação de GlnB e não chegou a ser total mesmo após 8h de reação (dados não apresentados). Esse resultado sugere que GlnBV100A também falha em sinalizar a ausência de íons amônio, impedindo a ativação de NifA e a expressão dos genes *nif*.

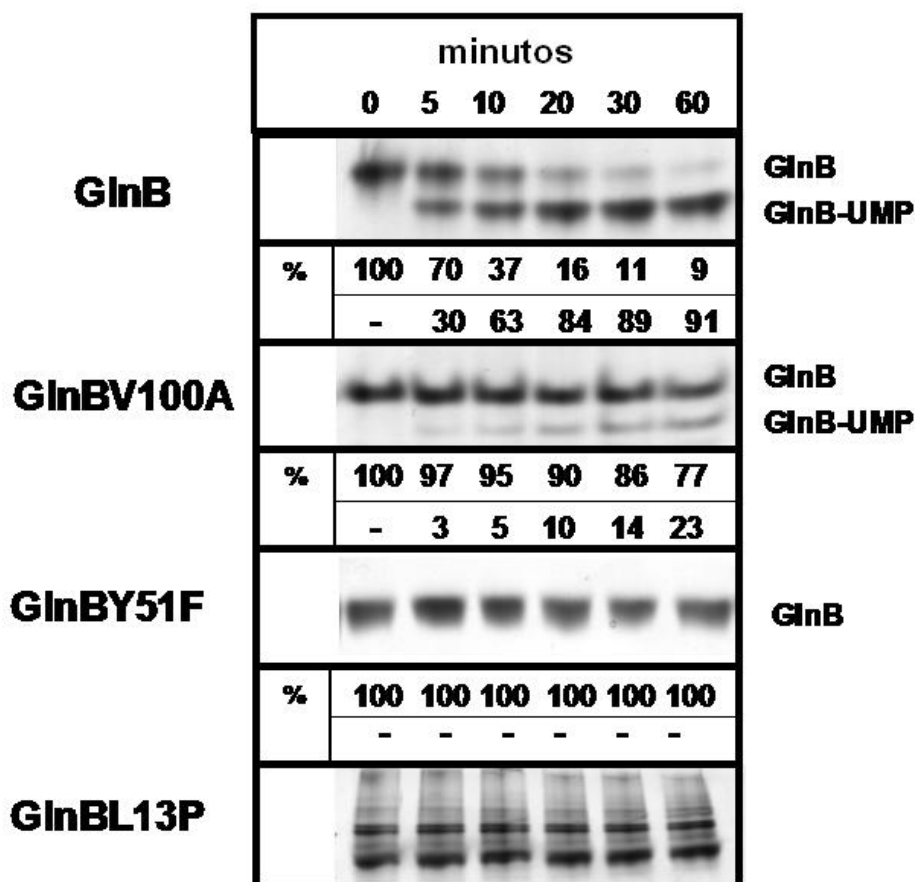


FIGURA 26. ANÁLISE POR ELETROFORESE NATIVA DOS PRODUTOS DE URIDILILAÇÃO IN VITRO DAS PROTEÍNAS GlnB, GlnBY51F, GlnBV100A E GlnBL13P DE *A. brasilense*. Uridililação das proteínas GlnB, GlnBV100A, GlnBL13P e GlnBY51F. O sistema de reação continha as proteínas PII purificadas (10 μ mol/L), ATP (0,1 mmol/L), 2- oxoglutarato (2 mmol/L), UTP (1 mmol/L) e GlnD (200 nmol/L). As reações foram paradas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos e alíquotas foram submetidas à eletroforese não desnaturante (10%), e o gel corado com Coomassie Blue. As bandas referentes às proteínas GlnB e GlnB-UMP, GlnBV100A e GlnBV100A-UMP e GlnBY51F foram submetidas à análise densitométrica e os valores estimados representam a porcentagem das formas não modificada ou uridililada de GlnB em relação à proteína total. FONTE: A autora (2009).

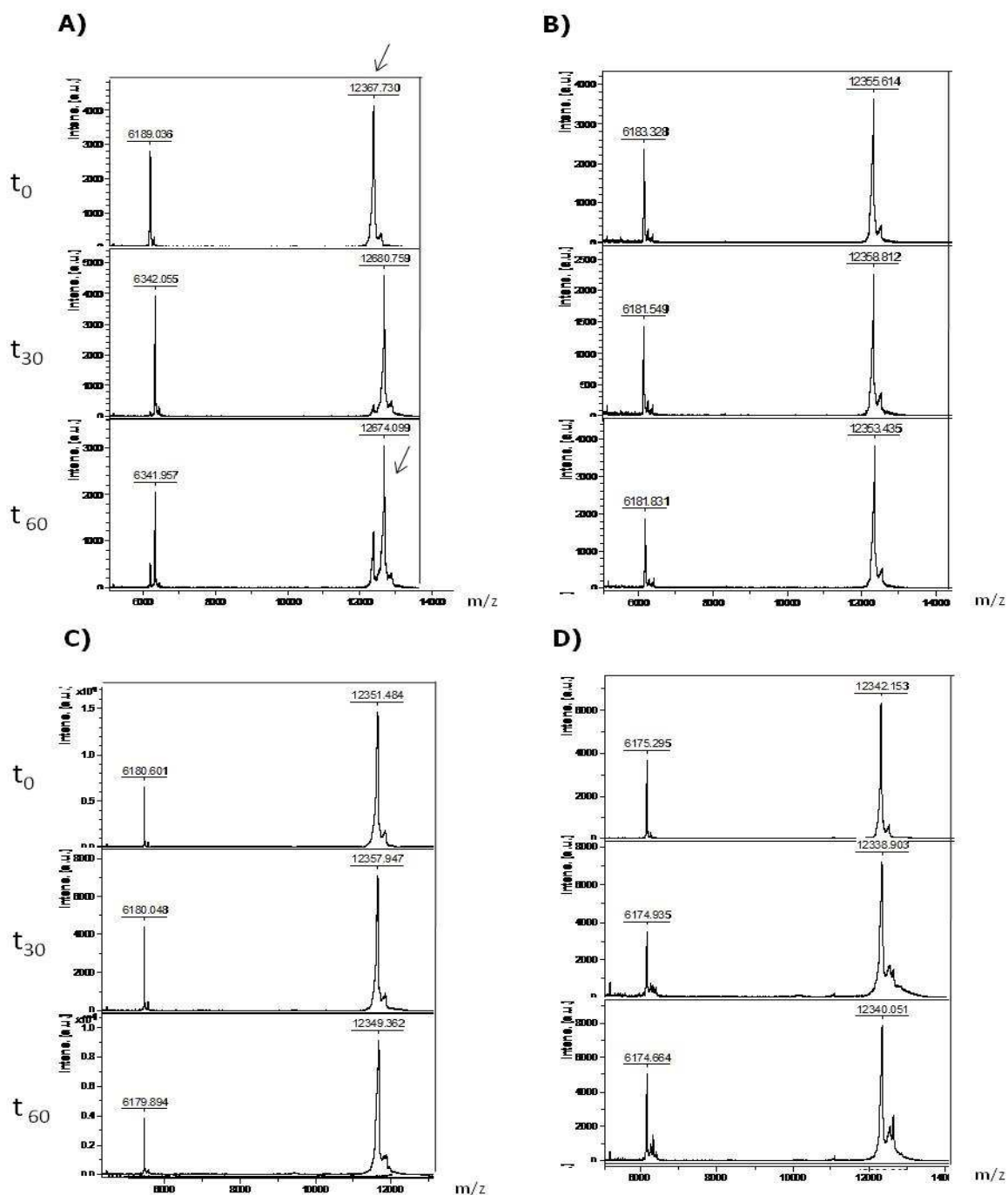


FIGURA 27. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB SELVAGEM E MUTANTES DE *A. brasilense*. Análise por espectrometria de massa MALDI-TOF do produto de uridililação das proteínas GlnB selvagem (A), GlnBL13P (B), GlnBY51F (C) e GlnBV100A (D) coletadas nos tempos 0, 30 e 60 minutos. As formas não modificadas e modificadas são e correspondentes aos picos com relação m/z aproximadamente 12350 e 12670, respectivamente. Os espectros de massa foram obtidos utilizando uma relação sinal/ruído de 30. FONTE: A autora (2009).

5.7 Efeito das substituições dos resíduos L13-P, V100-A e Y51-F no modelo estrutural da proteína GlnB de *A. brasilense*

A região mais variável das proteínas do tipo PII é a região C-terminal. A proteína GlnB de *E. coli* (EcGlnB) apresenta 2 folhas β nesta região, entretanto esse motivo estrutural não foi encontrado quando EcGlnB foi co-cristalizada com ATP; GlnB-ATP apresenta uma hélice 310 C-terminal (XU et al., 2001). Esse tipo de estrutura é comum em proteínas EcGlnK, EcGlnKATP (XU et al., 1998) e à proteína GlnB de *H. seropedicae* (BENELLI et al., 2002). A região C-terminal de EcGlnB apresenta quatro resíduos negativamente carregados (resíduos 106-109), enquanto que a proteína EcGlnK apresenta somente três resíduos (106, 108 e 109) e HsGlnB apresenta somente dois (106 e 110), o que justificaria a mudança estrutural desta região (BENELLI et al., (2002) a. A proteína GlnB de *A. brasilense* também apresenta dois resíduos negativamente carregados na região C-terminal (Glu106 e Asp110) sugerindo que a região C-terminal de GlnB de *A. brasilense* apresenta um motivo hélice 310 e assuma uma conformação semelhante à proteína HsGlnB.

Como a estrutura da proteína GlnB de *A. brasilense* ainda não foi determinada, seu modelo estrutural foi gerado a partir dos dados estruturais da proteína GlnB de *E. coli* (PDB: 2Pii, mmdblID:58151) (VASUDEVAN et al., 1995), através do programa 3D-jigsaw. Os modelos estruturais teóricos das proteínas mutantes GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F também foram gerados por esse programa. Os arquivos obtidos foram visualizados pelos programas RasMol e Pymol. A comparação do modelo estrutural de GlnB de *A. brasilense* com a estrutura de GlnK e GlnB de *E. coli* é apresentada na Figura 28, onde podemos evidenciar que a proteína GlnB de *A. brasilense* apresenta α -hélices mais longas do que as presentes nas proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*, e que a região C-terminal do modelo gerado de GlnB de *A. brasilense* apresentou semelhança com a porção C-terminal de GlnB de *E. coli*.

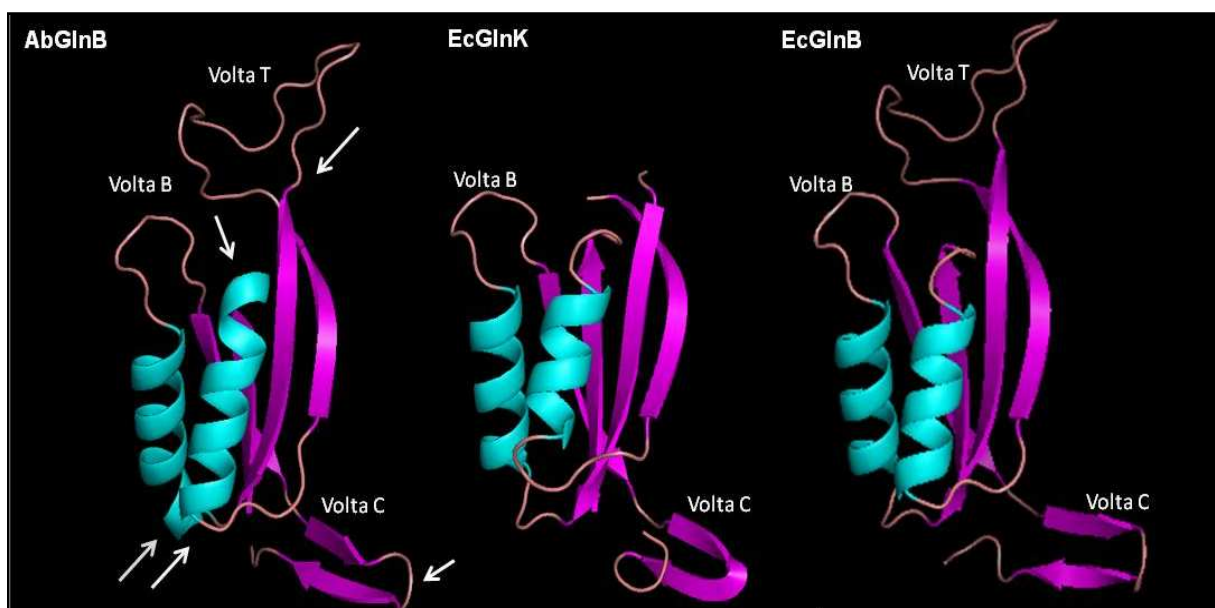


FIGURA 28. COMPARAÇÃO DO MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense* COM A ESTRUTURA DE GlnK e GlnB DE *E. coli*. O modelo estrutural da proteína GlnB de *A. brasilense* (AbGlnB) foi gerado pelo programa 3D-Jigsaw e comparado à estrutura de GlnK e GlnB de *E. coli* (EcGlnK, pdb= 1GNK, XU *et al.*, 1998 e EcGlnB, pdb:2Pii, VASUDEVAN *et al.*, 1995). As estruturas foram visualizadas pelo programa Pymol. Em setas brancas são destacadas as diferenças estruturais mais relevantes entre as proteínas. FONTE: A autora (2009).

Os modelos estruturais das proteínas GlnB selvagem e mutantes e seus elementos de estrutura secundária são apresentados na Figura 29. As α hélices das estruturas aparecem em rosa, as folhas β em amarelo e as voltas em azul. As ligações de hidrogênio são representadas em linhas pontilhadas. A proteína GlnB apresentou em sua estrutura 2 α hélices, 6 folhas β e 6 alças formando as voltas T, B e C ao longo da estrutura, como a proteína GlnB de *E. coli* (CARR *et al.*, 1996). As α hélices compreendem os resíduos: Pro10-Val23 (α_1) e Asp67-Ala81 (α_2), enquanto que as folhas β encontram-se entre os resíduos Lys2-Ile8 (β_1), Thr29-Gly35 (β_2), Leu56-Met65 (β_3), Lys90-Pro95 (β_4), Glu98-Val100 (β_5) e Lys107-Gly109 (β_6). A estrutura de GlnB é estabilizada por 61 ligações de hidrogênio, de acordo com o modelo gerado.

De acordo com o modelo gerado, a substituição do resíduo L13P levou a um encurtamento da α hélice 1, que passou a compreender os resíduos Pro13-Val23, e ganho de três alças (Pro10-Lys12; Val96 e Asp100) e mais 4 pontes de hidrogênio (Asp67-Ile112; Arg101-Thr104; Gly108-Asp110; Gly109-Ile112) comparada ao

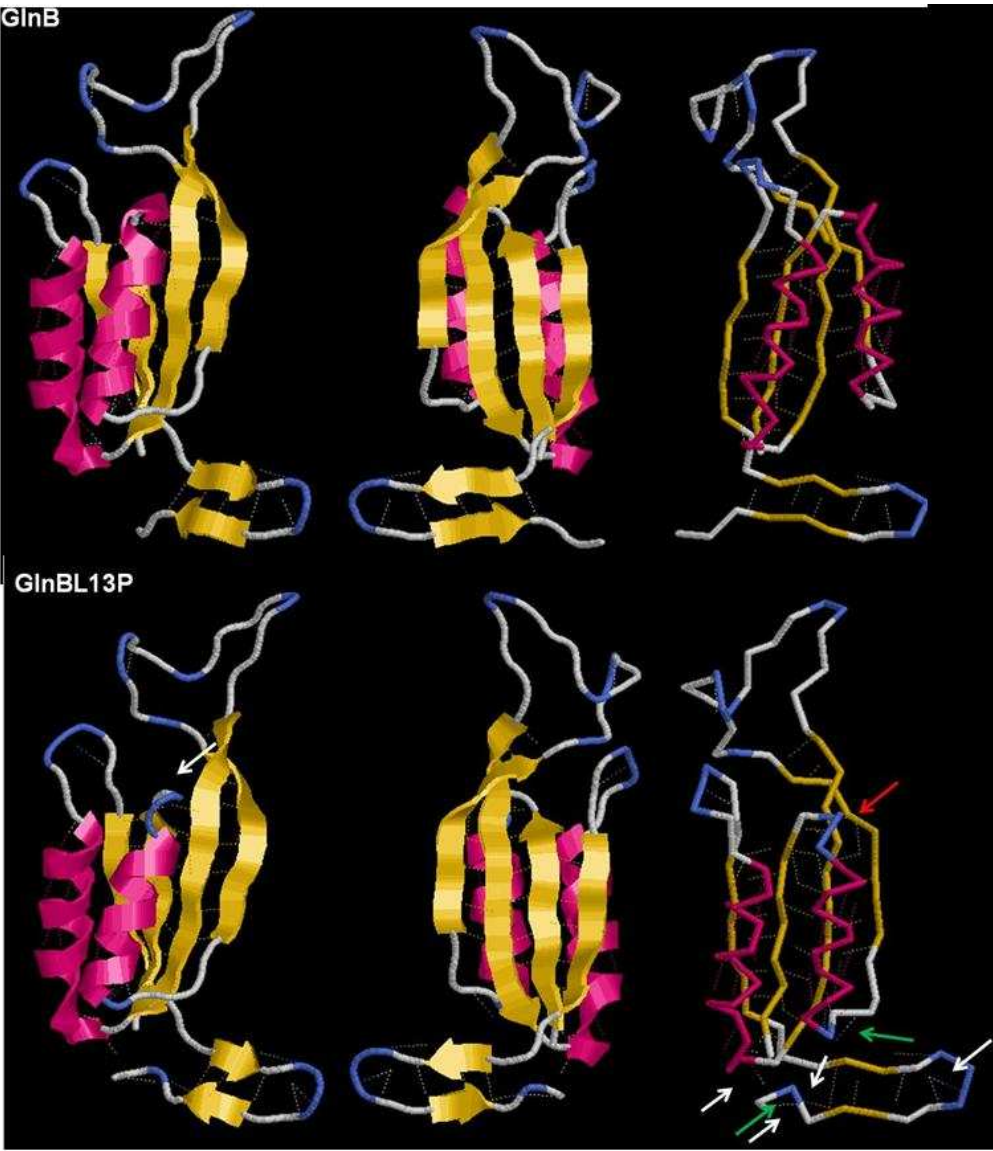
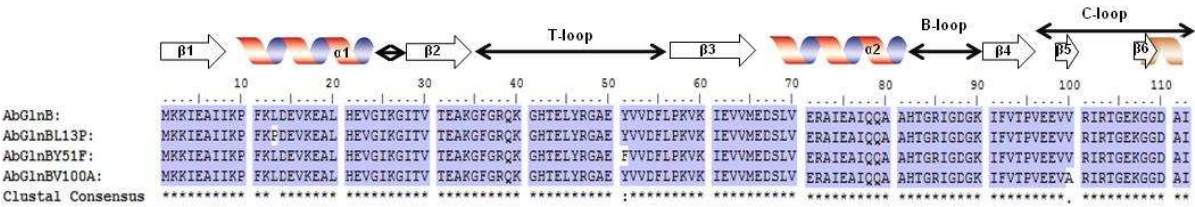
modelo de GlnB (Figura 29 e 31B). Quando os modelos estruturais de GlnBL13P e GlnB foram sobrepostos [Figura 30 (c e d)] as diferenças estruturais que a substituição da Leu13 por uma Pro provocou foram evidenciadas e levou a um encurtamento da α -hélice 1 e formação de uma alça nessa região. Isso se deve, devido à troca de um aminoácido apolar de cadeia aberta (Leu) por um aminoácido apolar de cadeia fechada (Pro).

A substituição do resíduo V100A não modificou a estrutura secundária da proteína e nem o número de pontes de hidrogênio presentes na estrutura, ou seja, o modelo indica que não houve alteração estrutural significativa na estrutura da proteína mutante (Figura 30). De fato, quando o modelo estrutural da proteína mutante GlnBV100A foi sobreposto ao de GlnB não foi evidenciado nenhuma alteração estrutura (Figura 30, E e F). As pontes de hidrogênio contidas na região mutagenizada desta proteína são apresentadas na Figura 12,C. Apesar do resíduo Val100 ter sido substituído por uma alanina, a ponte de hidrogênio que este resíduo faz com a Ile102 foi mantida. Apenas houve uma alteração da cadeia lateral. A Val100 é um aminoácido de cadeia lateral apolar e foi substituído por um resíduo do mesmo grupo que, embora menor, tem hidrofobicidade. Apesar desse resíduo ser conservado nas proteínas do tipo PII, frequentemente encontra-se substituído por uma isoleucina, como em GlnB de *R. rubrum*, GlnB e GlnK de *E. coli*.

A substituição do resíduo Y51F supendentemente levou a uma alteração no número de ligações de hidrogênio e no número de alças da estrutura. Houve um aumento de 61 para 64 ligações de hidrogênio e de 6 para 8 alças presentes na estrutura (figura 30). As novas pontes formadas envolveram os resíduos Lys2-Ile112, Arg101-Thr104 e Gly109-Ala11 e estão apresentadas com detalhes na Figura 31, A. A formação destas novas pontes aproximou a hélice α_1 da volta C, que poderia afetar a atividade de GlnBY51F. A sobreposição das estruturas de GlnB e GlnBY51F geradas é apresentada na Figura 30 (A), onde podemos evidenciar as alterações estruturais geradas por Y51F. A principal diferença estrutural obtida foi na porção C-terminal e envolveu a formação de novas pontes de hidrogênio e de uma nova alça (Figura 31, A).

De acordo com os modelos gerados, as substituições V100A e Y51F não levaram a alterações estruturais significativas na proteína GlnB. Entretanto, essas alterações conferiram significativas alterações funcionais na proteína GlnB quando analisada *in vitro* e *in vivo*. Com a finalidade de localizar os resíduos L13 e V100 na

estrutura trimérica de GlnB esses resíduos foram localizados na estrutura de GlnZ de *A. brasilense* (gentilmente cedido por HUERGO) que apresenta 81% de similaridade com GlnB (Figura 30, II). A região da volta-T, que contém o resíduo Y51 não foi resolvida nessa estrutura e por isso esse resíduo não foi localizado. No trímero de GlnZ, formado pelas cadeias A, B e C, os resíduos L13 também aparecem na α -hélice 1 e voltam-se para o interior da estrutura. Essa região não participa diretamente da interação entre monômeros, mas é possível que a mudança gerada altere de forma indireta esse contato, causando a mudança da atividade de GlnB. Por outro lado, a região da V100, volta-C, participa da estabilização da estrutura trimérica de PII, uma vez que ocorre a formação de ligações de hidrogênio entre a V100 de uma cadeia, com a I91 da cadeia seguinte, localizada na folha β 4. Além disso, nas proteínas GlnB de *E. coli* e *H. seropedicae*, essa região é onde liga-se o ATP. Embora as ligações de hidrogênio intercadeias tenham sido mantidas, a alteração da cadeia lateral gerada pode ter afetado a interação desta proteína com ATP, que resultaria na deficiência da sinalização dos níveis de energia pela proteína GlnBV100A.



(continua)

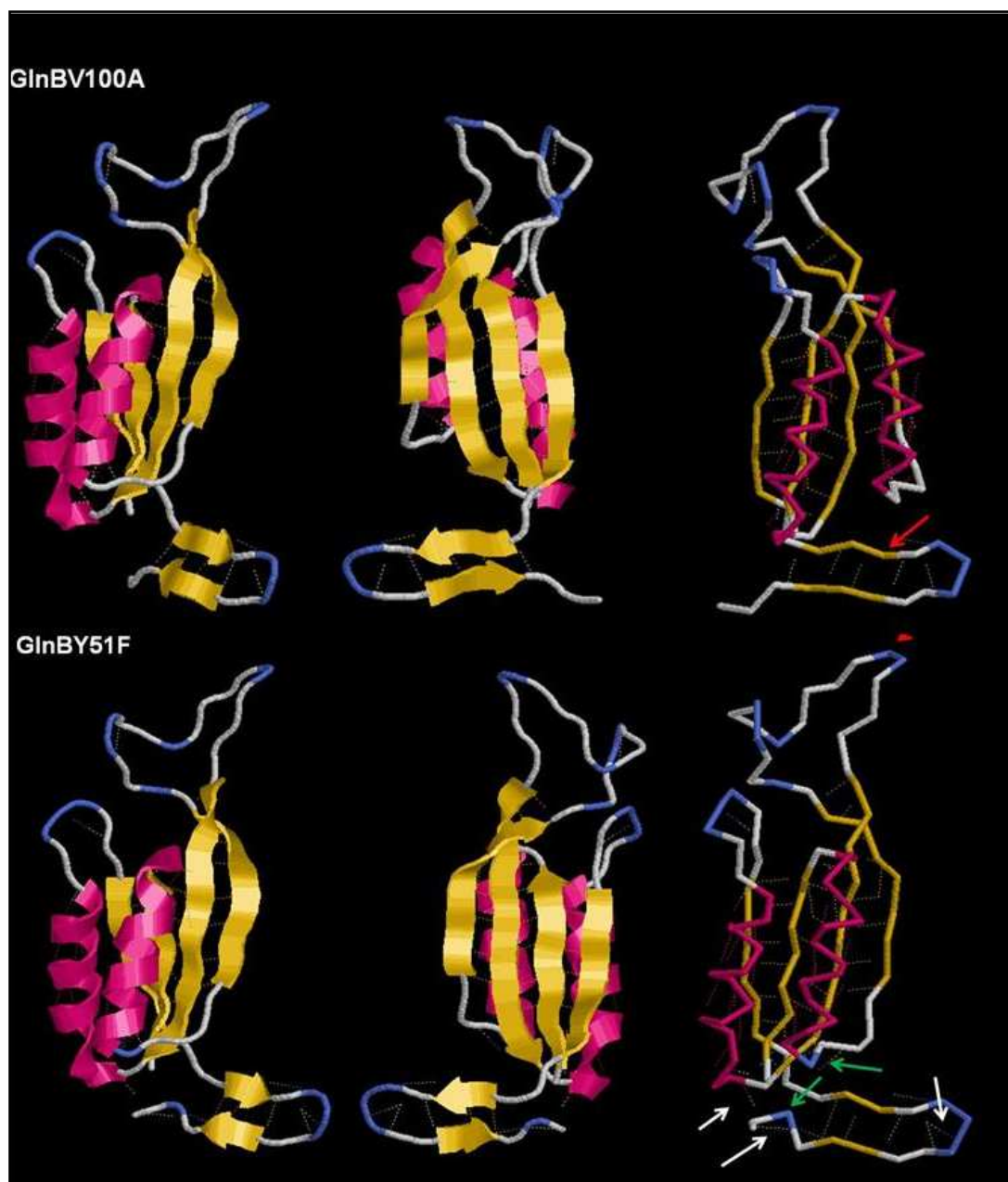


FIGURA 29. MODELOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS GLNB SELVAGEM E MUTANTES GlnBL13P, GlnBV100A E GlnBY51F DE *A. brasilense*. O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas GlnB, GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F foi realizado pelo programa Bioedit. Os elementos da estrutura secundária são apresentados. Os modelos estruturais teóricos foram criados pelo programa 3D-djsaw e analisados pelo programa Rasmol. Modelo estrutural de GlnB, GlnBL13P, GlnBV100A e GlnBY51F de *A. brasilense* são apresentados em três perspectivas cada. Os motivos estruturais α -hélice, folha- β e alças são representados em rosa, amarelos e azul e branco, respectivamente. As setas vermelhas destacam o resíduo mutagenizado, as setas indicam as pontes de hidrogênio (setas brancas) e alças (setas verdes) geradas pela mudança de resíduos. FONTE: A autora (2009).

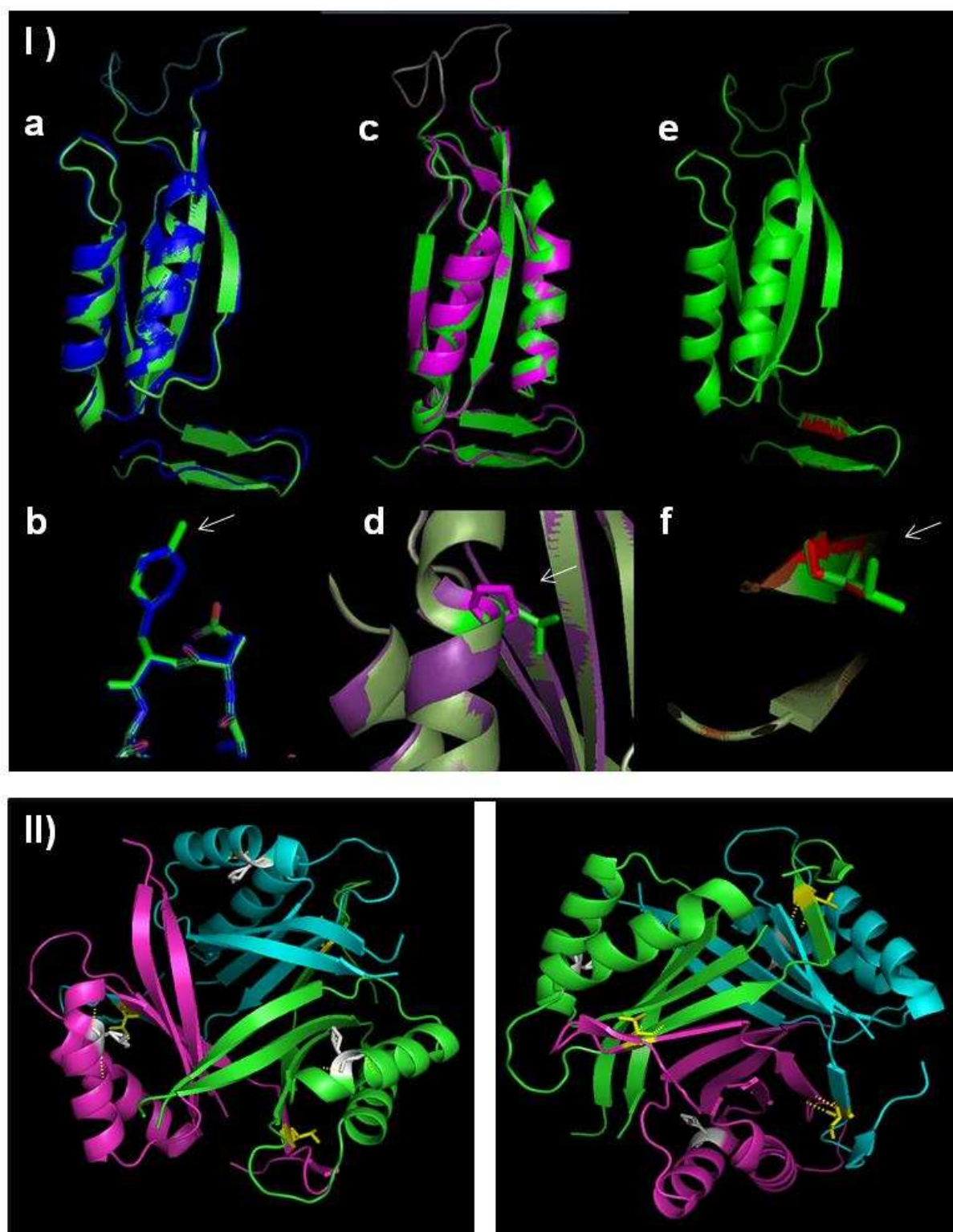


FIGURA 30. COMPARAÇÃO DOS MODELOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS PII DE *A. BRASILENSE*. Os modelos estruturais das proteínas GlnB selvagem e mutantes foram criados pelo programa 3D-dijsaw. I) Sobreposição dos modelos estruturais de GlnB (verde) e GlnBY51F (azul) (a), GlnB e GlnBL13-P (rosa) (c) e GlnB e GlnBV100A (vermelho) (e). As regiões mutagenizadas de cada mutante são apresentadas em destaque (setas brancas) nas estruturas em b (Y51F), d (L13P) e f (V100A) e os resíduos L13 (branco) e V100 (amarelo) são destacados no trîmero de GlnZ em II. FONTE: A autora (2009).

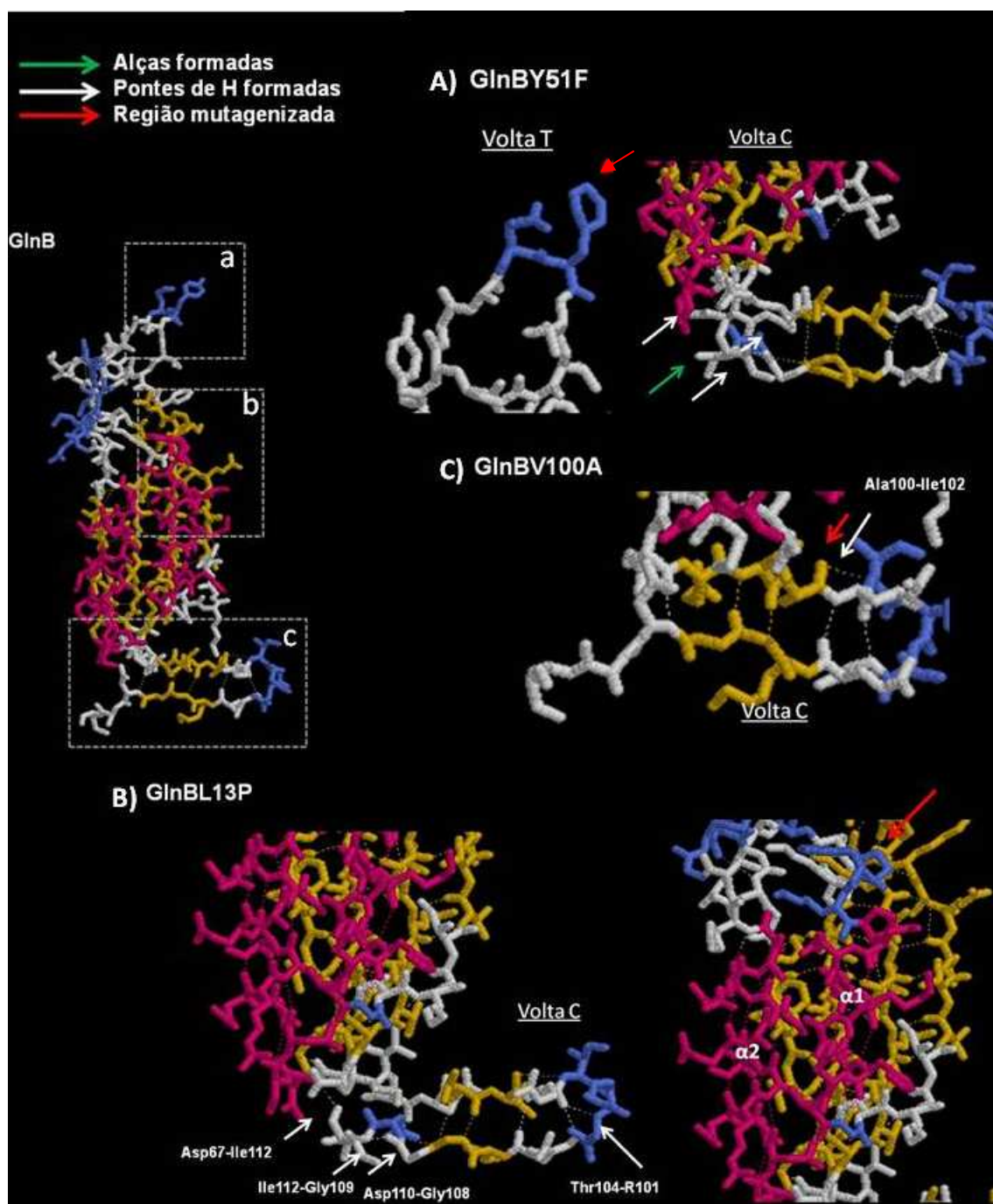


FIGURA 31. EFEITO DAS SUBSTITUIÇÕES L13-P, Y51F E V100A NO MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense*. Os modelos estruturais foram gerados pelo programa 3D-Jigsaw e analisados pelo programa Rasmol. As regiões mutagenizadas de GlnB são apresentadas (caixas pontilhadas, a,b e c). A mudança estrutural causada por GlnBY51 (A), GlnBV100A (B) e GlnBL13P (C) são apresentadas. FONTE: A autora (2009).

5.8 Determinação das constantes de dissociação de ATP, ADP, AMP e 2-oxoglutarato da proteína GlnB de *A. brasilense*

As proteínas GlnB são proteínas transdutoras de sinais e integram a sinalização de carbono, amônio e energia para a célula (FORCHHAMMER, 2008). A uridililação de GlnB ocorre em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular, sendo que em baixos níveis de amônio GlnB encontra-se na forma uridililada, e em altos níveis de amônio esse grupamento é removido. As proteínas GlnB também são capazes de associar-se ao sinalizador dos níveis de carbono, 2-oxoglutarato e aos níveis de energia ATP, ADP e AMP (FORCHHAMMER, 2008). A ligação de moléculas efetoras como o ATP, ADP, AMP e 2-oxoglutarato é importante para modular não apenas a uridililação de PII, mas sua interação com outras moléculas alvo, como NtrB (KAMBEROV *et al.*, 1995), DraT e DraG (HUERGO *et al.*, 2009) e AmtB (DURAND e MERRICK, 2006; HEINRICH *et al.*, 2006; HUERGO *et al.*, 2007; WOLFE *et al.*, 2007).

As constantes de dissociação de 2-oxoglutarato, ATP, ADP e AMP da proteína GlnB de *A. brasilense* foram determinadas pela variação de entalpia gerada pela sua ligação à GlnB por microcalorimetria. Para a determinação da constante de dissociação de 2-oxoglutarato de GlnB, 50-130 $\mu\text{mol/L}$ de proteína purificada foram dialisadas na presença de ATP (5 mmol/L) e MgCl_2 (5 mmol/L). Foi considerado que proteínas do tipo PII apresentam 3 sítios de ligação para 2-oxoglutarato (XU *et al.*, 2001) para o cálculo da concentração do titulante. A proteína GlnB (107,8 $\mu\text{mol/L}$) foi titulada com uma solução de 2-oxoglutarato (1,83 mmol/L) e o gráfico gerado é apresentado na Figura 32. Os dados permitiram determinar três constantes de dissociação de 2-oxoglutarato $K_{d1} = 6,7 \mu\text{mol/L}$, $K_{d2} = 97,8 \mu\text{mol/L}$ e $K_{d3} = 30,3 \mu\text{mol/L}$. Os dados obtidos confirmam que em *A. brasilense* a ligação de 2-oxoglutarato também ocorre de maneira cooperativa. A ligação de uma molécula de 2-oxoglutarato a um sítio de alta afinidade promove uma forte cooperatividade negativa para a ligação de uma segunda molécula. Se as concentrações de 2-oxoglutarato intracelulares em *A. brasilense* forem semelhantes aquelas descritas para *E. coli* (0,1-0,9 mmol/L) (SENIOR *et al.*, 1975) o sítio de maior afinidade do trímero encontra-se permanentemente ligado à uma molécula de 2-oxoglutarato, enquanto que o segundo e o terceiro sítios seriam ocupados em altas concentrações de 2-oxoglutarato. De acordo com o resultado obtido, o terceiro sítio apresentaria um

aumento de afinidade após ligação de uma segunda molécula de 2-oxoglutarato, permitindo que os três sítios de 2-oxoglutarato de GlnB fossem ocupados com o aumento da concentração intracelular de 2-oxoglutarato.

Estudos de ligação de 2-oxoglutarato em GlnB de *E. coli* foram realizados por Jiang e Ninfa (2007) utilizando uma técnica de centrifugação/filtração dos efetores marcados radioativamente. Para a ligação de 2-oxoglutarato, foram identificados três sítios de ligação para esta molécula à GlnB com afinidades de $K_{d1} = 12 \mu\text{mol/L}$, $K_{d2} = 120 \mu\text{mol/L}$ e $K_{d3} = 5000 \mu\text{mol/L}$, na presença de ATP (4 mmol/L) (JIANG e NINFA, 2007). Em outro estudo realizado com a proteína PII de *Arabidopsis thaliana*, foi encontrada somente uma constante de ligação para 2-oxoglutarato, cuja afinidade foi alterada pela presença de ATP. Na presença de ATP a K_d de 2-oxoglutarato foi de $106,8 \mu\text{mol/L}$, enquanto que na ausência de ATP e presença de ADP, a constante de dissociação foi $K_{d1} = 131,8 \mu\text{mol/L}$ (SMITH *et al.*, 2003). A ligação de 2-oxoglutarato à GlnK de *Bacillus subtilis* é não cooperativa e independe da presença de ATP (HEINRICH *et al.*, 2006). Assim como em *E. coli*, GlnB de *A. brasilense* apresenta 3 sítios de ligação de 2-oxoglutarato. Entretanto, em *E. coli*, o terceiro sítio parece estar desocupado, exceto se os níveis de 2-oxoglutarato ultrapassarem o limite máximo previsto da variação intracelular deste composto (0,9 mmol/L) em resposta à variação de nitrogênio intracelular.

Para a determinação da constante de dissociação de ATP às proteínas GlnB, cerca de 50 $\mu\text{mol/L}$ de proteína foram dialisadas na presença de 2-oxoglutarato (5 mmol/L) e cloreto de magnésio (5 mmol/L). As proteínas foram tituladas com uma solução de ATP (3,8 mmol/L). O gráfico gerado pela titulação de GlnB com ATP na presença de Mg^{2+} está apresentado na Figura 33. O perfil gerado permitiu a obtenção de uma única constante de ligação de ATP à GlnB, de valor $K_d = 3,7 \mu\text{mol/L}$. Dado que a proteína GlnB provavelmente também apresenta 3 sítios de ligação para ATP, em *A. brasilense* os sítios de ligação para esta molécula parecem apresentar igual afinidade pelo ATP. Este resultado difere daquele obtido para a proteína GlnB de *E. coli*, onde foram encontradas 3 constantes de dissociação: $K_{d1} = 5 \mu\text{mol/L}$, $K_{d2} = 35 \mu\text{mol/L}$ e $K_{d3} = 1000 \mu\text{mol/L}$, na presença de 0,05 mmol/L de 2-oxoglutarato. Quando a concentração de 2-oxoglutarato foi aumentada para 2 mmol/L, as constantes de dissociação foram $K_{d1} = 0,35 \mu\text{mol/L}$, $K_{d2} = 30 \mu\text{mol/L}$ e $K_{d3} = 300 \mu\text{mol/L}$ (JIANG e NINFA, 2007). A proteína GlnK de *B. subtilis* apresentou uma constante de dissociação de ATP na ausência de Mg^{2+} e presença de 2-

oxoglutarato de $K_{d1} = 20,3 \mu\text{mol/L}$, sendo que essa afinidade é ainda reduzida na presença do cátion divalente (HEINRICH *et al.*, 2006). Os dados obtidos para *A. brasilense* são semelhantes aos dados obtidos pela titulação de PII de *A. thaliana*, na presença de 1 mmol/L de 2-oxoglutarato ($K_{d1} = 3,0 \mu\text{mol/L}$). Neste organismo, a ausência de 2-oxoglutarato levou à diminuição da afinidade de GlnB pelo ATP na ordem de 4,5 vezes (SMITH *et al.*, 2003).

A concentração intracelular estimada de ATP em *E. coli* é de 3 mmol/L (NEUHARD *et al.*, 1987) e parece não variar em função do crescimento celular (SCHNEIDER *et al.*, 2004). Nestas condições, ATP estaria sempre ligado à GlnB, independentemente da presença de 2-oxoglutarato e um sistema mais complexo parece regular a interação PII, ATP/ADP (JIANG e NINFA, 2007). Diferentemente de *E. coli*, a concentração intracelular de ATP, ADP e AMP em bactérias fixadoras de nitrogênio como *A. vinelandii*, *K. pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum* (UPCHURCH e MORTENSON, 1980) e *A. brasilense* (dados não apresentados) variam em função dos níveis de amônio intracelular. Desta forma, a ligação destes efetores à GlnB pode ser regulada pela sua disponibilidade intracelular.

A titulação de GlnB com AMP e ADP foi realizada após diálise de GlnB purificada contra tampão 50 mmol/L Tris.HCl pH7,5, contendo 2-oxoglutarato (5 mmol/L) e MgCl_2 (5 mmol/L). Nessas condições, ADP apresentou fraca ligação à GlnB e não foi possível calcular a constante de dissociação deste efector (figura 35). Os experimentos de titulação indicaram que AMP não interage com GlnB nas condições testadas (Figura 36). A ausência de 2-oxoglutarato favoreceu a ligação do ADP à GlnB, entretanto, a constante de dissociação não foi determinada. Resultado semelhante foi descrito para a ligação de ADP à proteína PII de *A. thaliana*. A constante de dissociação aumentou de $K_{d1} = 69,9$ para $K_{d1} = 251,2$ na presença de 2-oxoglutarato e o AMP também não se ligou à PII de *A. thaliana*, nas condições testadas (SMITH *et al.*, 2003). Os resultados obtidos sugerem que, na presença de 2-oxoglutarato e MgCl_2 , o sítio de ligação para ADP e AMP não esteja tão disponível, favorecendo a ligação de ATP. A proteína GlnB de *E. coli* também apresenta apenas uma constante de dissociação para ADP, que parece independe da presença de 2-oxoglutarato (JIANG e NINFA, 2007).

A Figura 37 apresenta a comparação dos dados obtidos pela titulação de GlnB com os efetores 2-oxoglutarato, ATP, ADP e AMP. Os resultados obtidos mostram que o efector que apresenta maior afinidade por GlnB nas condições

testadas é o ATP. A ligação de ADP na ausência de 2-oxoglutarato foi semelhante à ligação de 2-oxoglutarato à GlnB na presença de ATP. O AMP e o ADP apresentam ligação baixa ou nula à GlnB quando na presença de 2-oxoglutarato. A ligação de ATP com alta afinidade na presença de 2-oxoglutarato é coerente com o fato de que *in vivo* a diminuição dos níveis de amônio acarreta um aumento na concentração de 2-oxoglutarato e ATP. Nessa situação, ATP apresenta alta afinidade por GlnB e liga-se em seus três sítios. A ligação de ADP e AMP nessas condições é nula. De forma contrária, o aumento dos níveis de nitrogênio leva à diminuição da concentração de 2-oxoglutarato e de ATP, nestas condições, a ligação de ADP seria favorecida.

A ligação de 2-oxoglutarato e ATP nas proteínas mutantes GlnBY51F e GlnBV100A também foi estudada. As figuras 38 e 39 apresentam os resultados obtidos. De acordo com os dados gerados, a ligação de 2-oxoglutarato foi semelhante em todas as proteínas testadas, indicando que o sítio de ligação desta molécula não é alterado pelas substituições V100-A ou Y51F (Figura 39). Yildiz e colaboradores (2007) sugeriram que a ligação de 2-oxoglutarato à proteína GlnK de *Methanococcus jannaschii* envolve sua estabilização pelo resíduo Y51 desta proteína, quando a alça-T encontra-se rígida, devido à presença de ATP e $MgCl_2$ (YILDIZ *et al.*, 2007). A substituição deste resíduo não levou à alteração da ligação de 2-oxoglutarato à GlnB de *A. brasilense*, o que pode sugerir que neste organismo 2-oxoglutarato liga-se em outra região. Entretanto, a interação de 2-oxoglutarato com o resíduo Y51 em *M. jannaschii* ocorre via anel aromático deste resíduo, o qual foi preservado no caso de GlnBY51F. Portanto, a hipótese de que a ligação de 2-oxoglutarato ocorra nesta região em *A. brasilense* não pode ser descartada.

As proteínas mutantes GlnBV100A e GlnBY51F apresentaram diminuição da afinidade de ligação de ATP quando comparada à GlnB, sendo que essa diminuição foi mais proeminente na proteína GlnBV100A (Figura 39). A injeção inicial de ATP promove uma variação de calor grande na proteína GlnB, que diminui cerca de 3 vezes na proteína mutante GlnBV100A. Dados estruturais mostraram que o resíduo R101 da proteína GlnK de *E. coli*, é importante para a ligação de ATP (XU *et al.*, 1998). A mudança V100A possivelmente afeta o resíduo R101, levando à diminuição da afinidade da proteína mutante por ATP.

A ligação de ATP nas proteínas GlnK de *E. coli* e de *M. jannaschii* causa um efeito sobre a alça T, tornando-a mais rígida que, em *M. jannaschii*, favorece à ligação de 2-oxoglutarato (YILDIZ *et al.*, 2007). Além disso, essa ligação causa

mudanças na distribuição de carga de GlnK, além de causar mudanças conformacionais na alça B desta proteína, que podem ser importantes para sua interação com outras proteínas (XU *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos mostram que as proteínas GlnB de *A. brasilense* são capazes de ligarem-se ao 2-oxoglutarato, ATP e ADP nas condições testadas. A ligação de ADP responde à presença de 2-oxoglutarato. Possivelmente, sua presença favoreça a ligação de ATP à GlnB, enquanto que, quando ausente, a ligação de ADP à GlnB é favorecida. Além disso, a substituição do resíduo R101 levou à drástica diminuição da afinidade de GlnB por ATP. Isso ocorre, provavelmente, devido à participação dessa região na ligação de ATP. Baseado nos dados obtidos para *M. jannaschii*, a ligação de ATP na presença de Mg^{2+} ainda favoreceria uma mudança conformacional na alça-T. Provavelmente esse efeito não ocorre na proteína mutante GlnBV100A, o que poderia desfavorecer a sua interação com a proteína GlnD e, portanto, a sua uridililação.

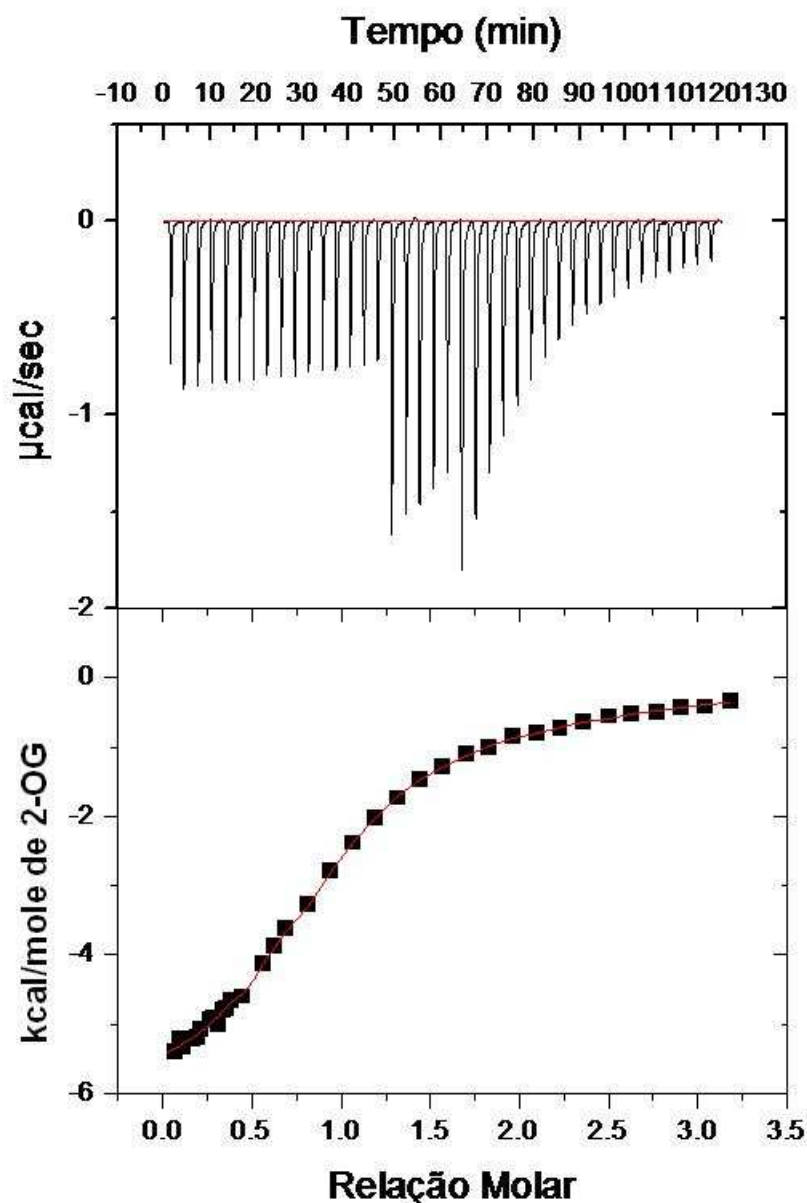


FIGURA 32: TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense* COM 2-OXOGLUTARATO. A proteína GlnB purificada ($107,8 \mu\text{mol/L}$) foi dialisada em tampão 50 mmol/L Tris. HCl pH 7,5, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L de ATP e 5 mmol/L de MgCl_2 . A titulação de GlnB por 2-oxoglutarato (2-OG) ($1,83 \text{ mmol/L}$) se deu em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados pelo programa Origin 7.0. A relação molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. FONTE: A autora (2009).

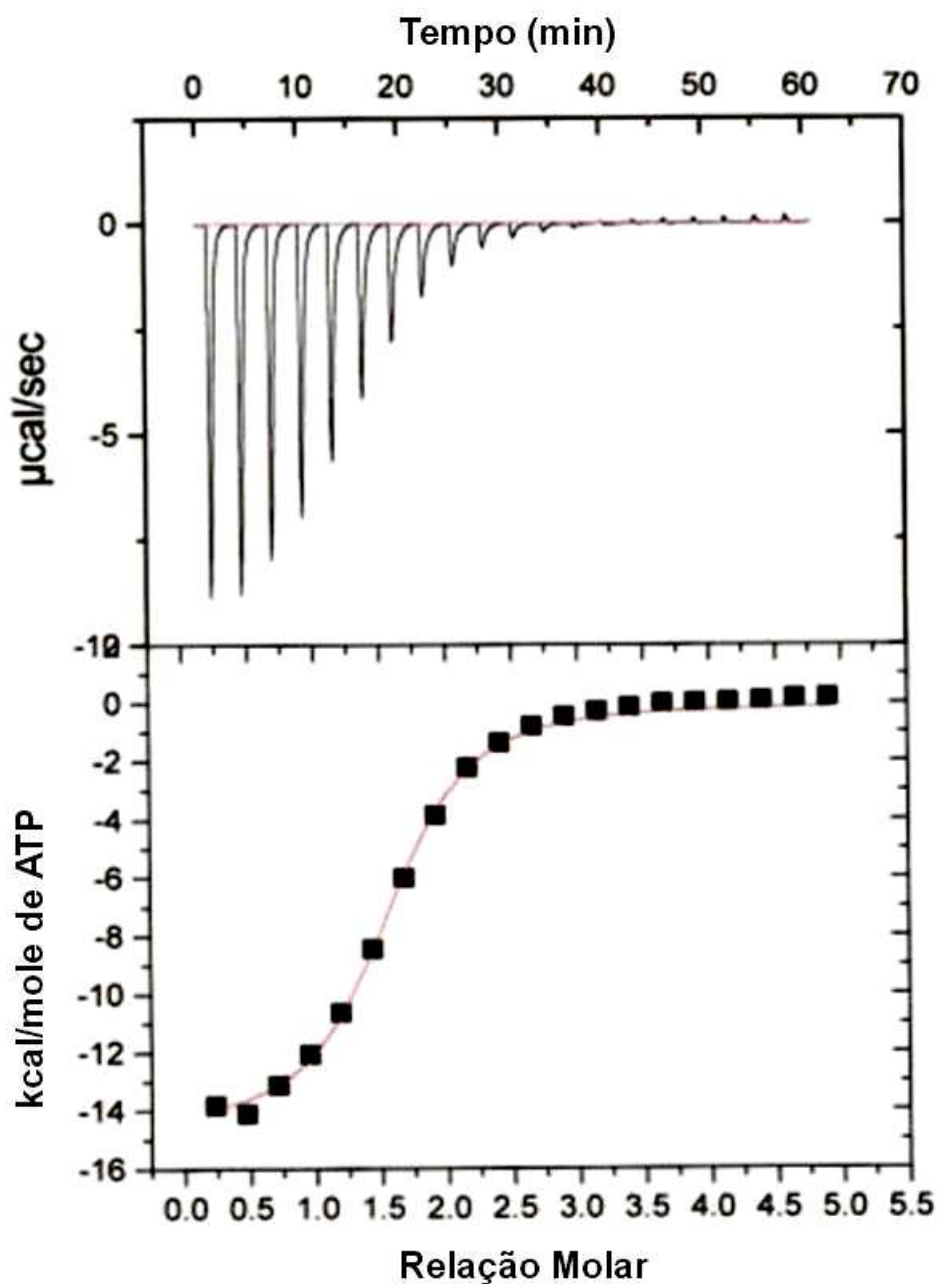


FIGURA 33. TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA LIGAÇÃO DE ATP À PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense*. A proteína GlnB purificada (49,8 $\mu\text{mol/L}$) foi dialisada em tampão Tris.HCl (50 mmol/L, pH 7,5) contendo 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L de 2-oxoglutarato e 5 mmol/L de MgCl_2 e titulada com ATP (3,8mmol/L). A titulação de GlnB por ATP se deu em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados pelo programa Origin 7.0. A relação molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. FONTE: A autora (2009).

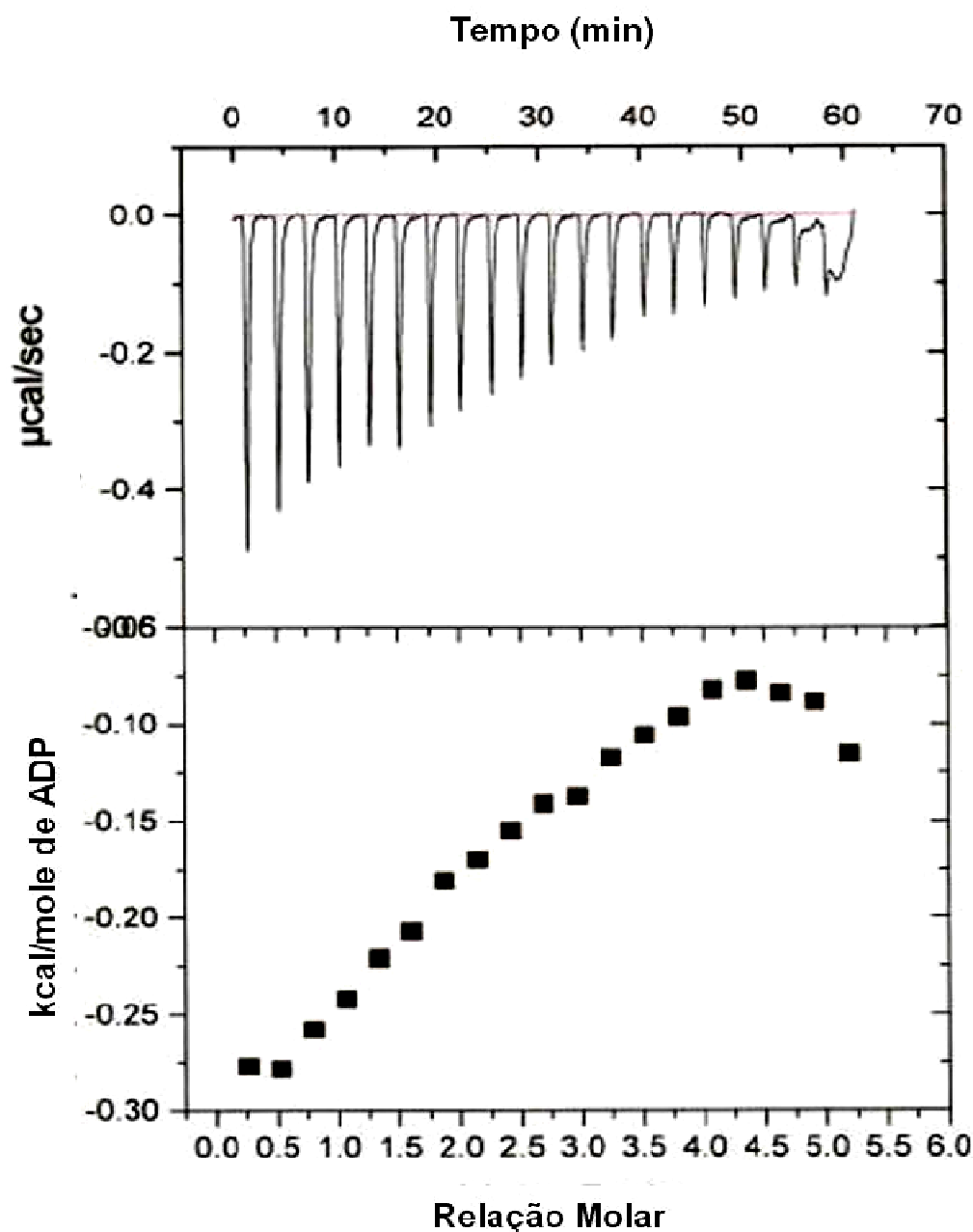


FIGURA 34. TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA LIGAÇÃO DE ADP À PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense*. A proteína GlnB purificada ($110,5 \mu\text{mol/L}$) foi dialisada em tampão Tris. HCl (50 mmol/L , pH 7,5) contendo 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L de 2-oxoglutarato e 5 mmol/L de MgCl_2 e titulada com ADP ($8,35 \text{ mmol/L}$). A titulação de GlnB por ADP se deu em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados pelo programa Origin 7.0. A relação molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. FONTE: A autora (2009).

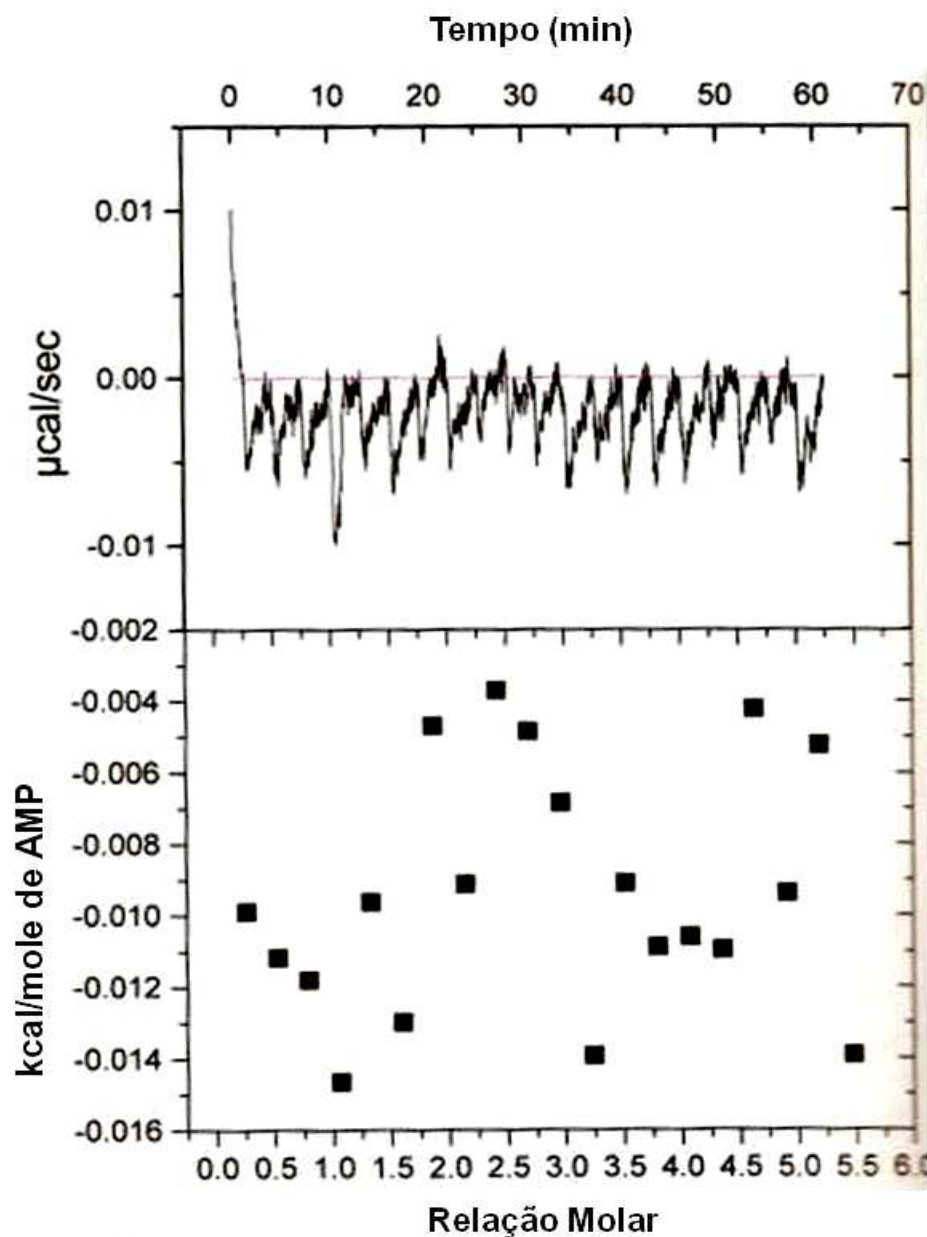


FIGURA 35. TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA LIGAÇÃO DE AMP À PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense*. A proteína GlnB purificada (110,5 $\mu\text{mol/L}$) foi dialisada em tampão Tris. HCl (50 mmol/L, pH 7,5) contendo 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L de 2-oxoglutarato e 5 mmol/L de MgCl_2 e titulada com AMP (8,35 mmol/L). A titulação de GlnB por AMP se deu em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados pelo programa Origin 7.0. A relação molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. FONTE: A autora (2009).

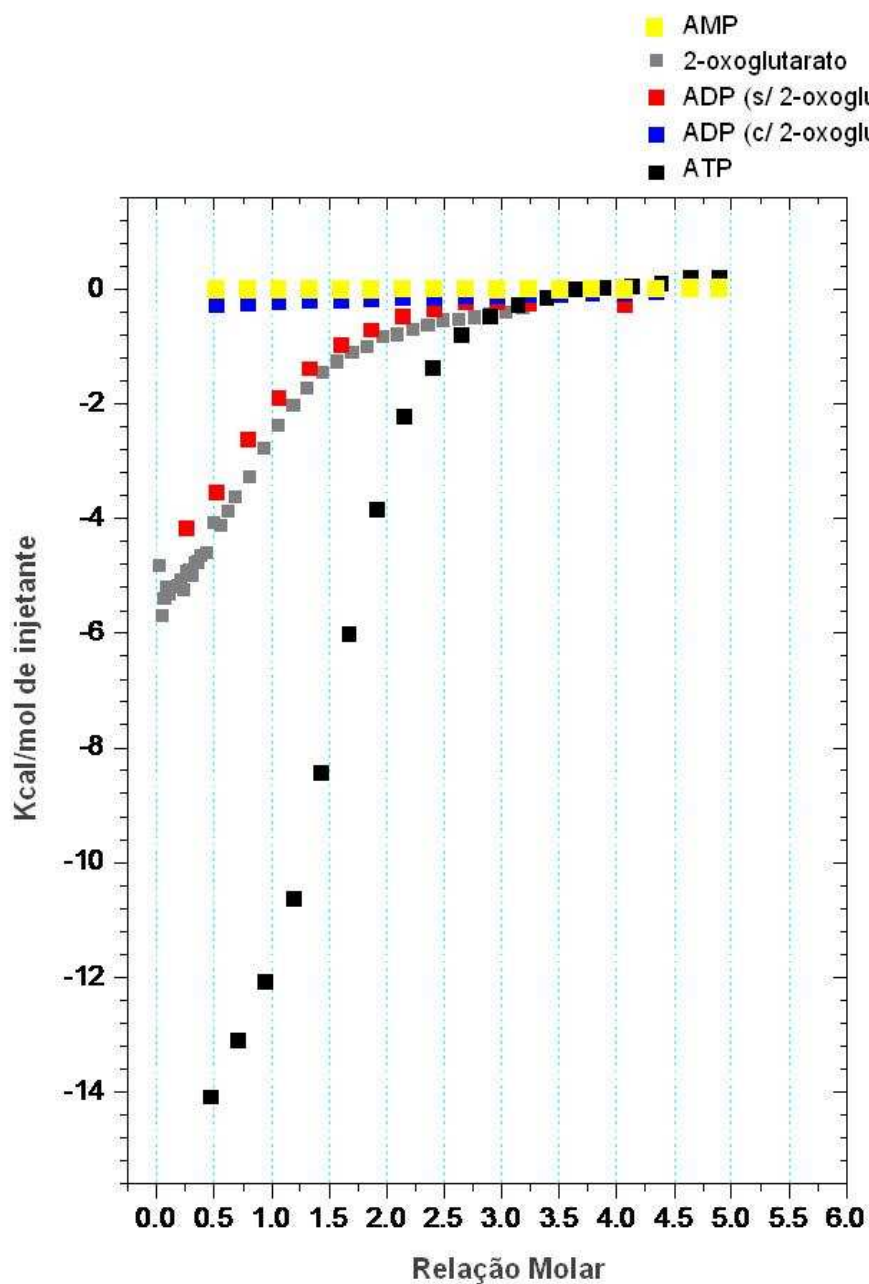


FIGURA 36. COMPARAÇÃO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO DE ATP, ADP, AMP E 2-OXOGLUTARATO À PROTEÍNA GlnB DE *A. BRASILENSE*. Os dados gerados pela titulação da proteína GlnB por ATP (figura 35), ADP (na presença e ausência de 2-oxoglutarato) (figura 36), AMP (figura 37) e 2-oxoglutarato (figura 34) foram analisados e comparados pelo programa Origin 7.0. A relação molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. FONTE: A autora (2009).

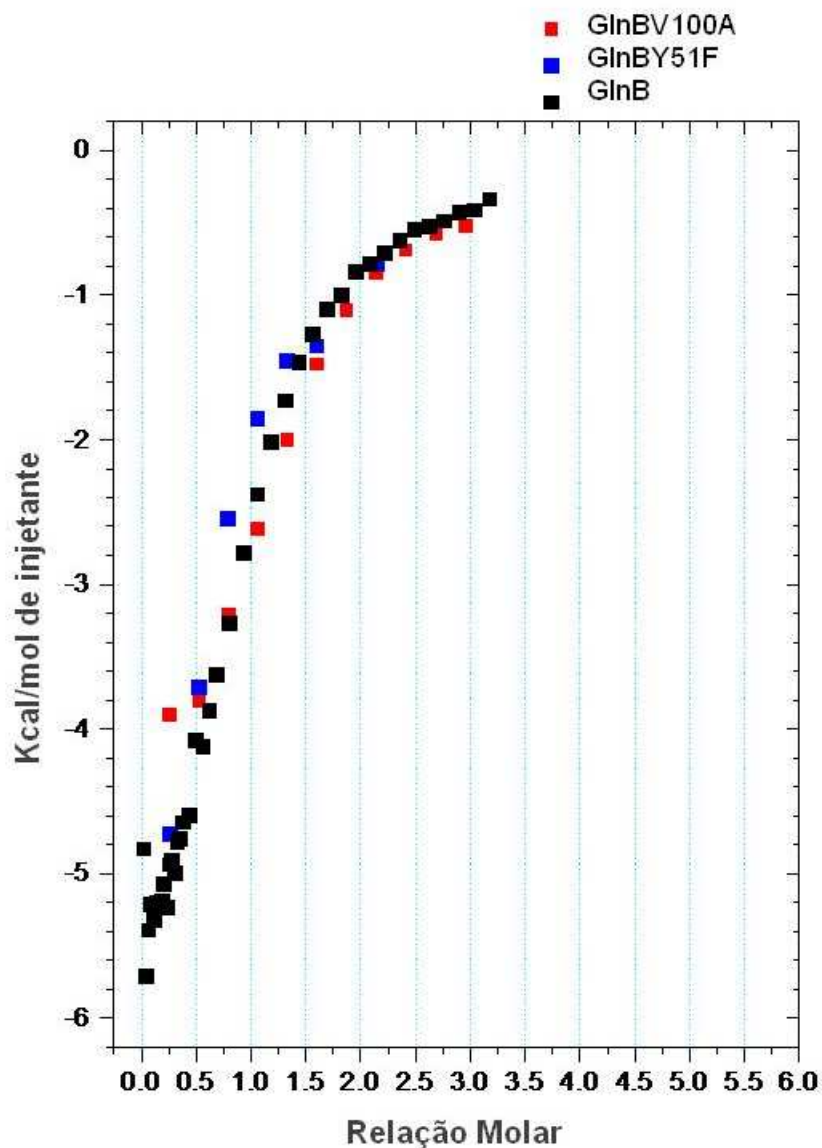


FIGURA 37. COMPARAÇÃO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO DE 2-OXOGLUTARATO ÀS PROTEÍNA GlnB, GlnBV100A e GlnBY51F DE *A. brasilense*. As proteínas GlnB (107,8 $\mu\text{mol/L}$), GlnBY51F (67,4 $\mu\text{mol/L}$) e GlnBV100A (136,6 $\mu\text{mol/L}$) purificadas foram dialisadas em tampão Tris. HCl (50 mmol/L, pH 7,5) contendo 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L de ATP e 5 mmol/L de MgCl_2 e titulada com 2-oxoglutarato (1,83, 5,1 e 10,3 mmol/L, respectivamente). A titulação se deu em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados pelo programa Origin 7.0. A relação molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. FONTE: A autora (2009).

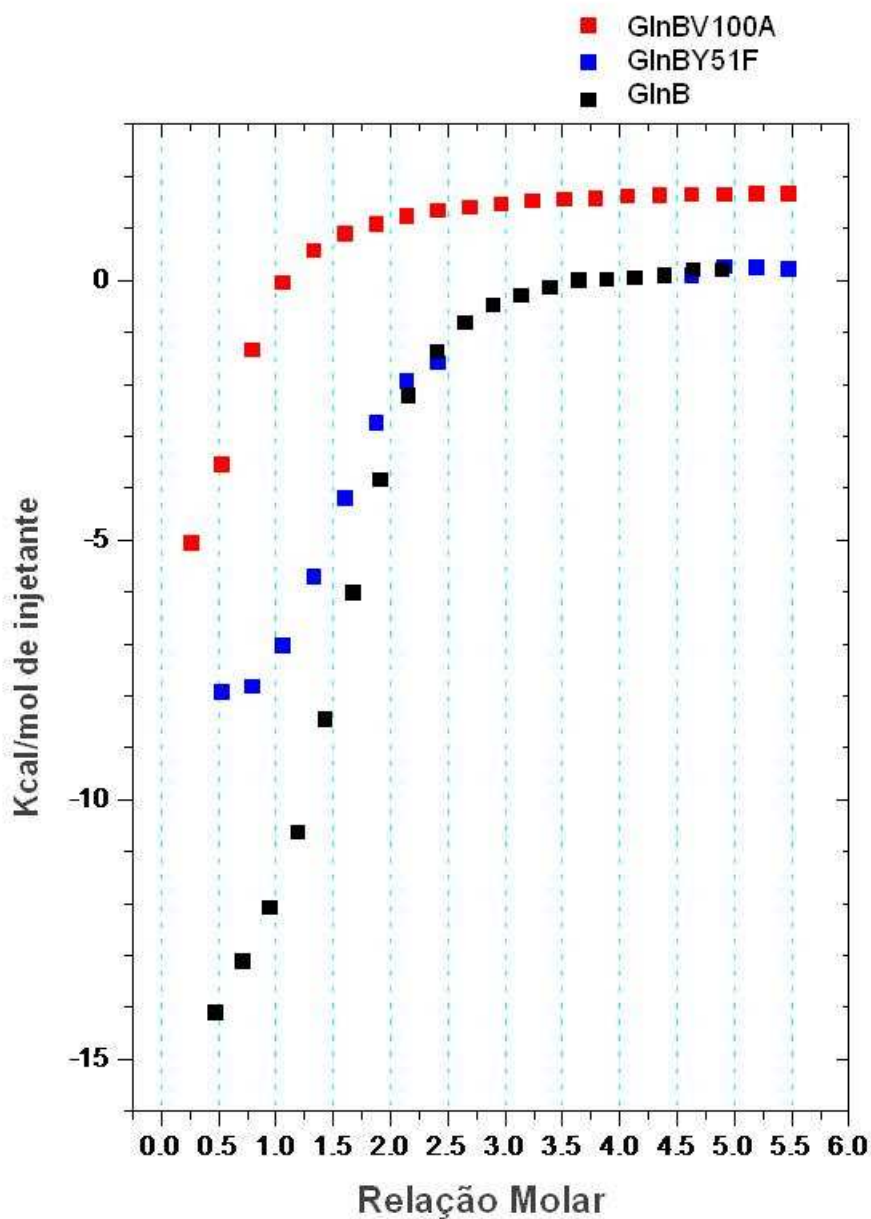


FIGURA 38. COMPARAÇÃO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO DE ATP NAS PROTEÍNAS GlnB, GlnBV100A e GlnBY51F DE *A. brasilense*. As proteínas GlnB (107,8 $\mu\text{mol/L}$), GlnBY51F (67,4 $\mu\text{mol/L}$) e GlnBV100A (136,6 $\mu\text{mol/L}$) purificadas foram dialisadas em tampão Tris. HCl (50 mmol/L, pH 7,5) contendo 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L de 2-oxoglutarato e 5 mmol/L de MgCl_2 e titulada com ATP (3,8, 5,1 e 10,3 mmol/L, respectivamente). A titulação se deu em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados pelo programa Origin 7.0. A relação molar refere-se à concentração do ligante/concentração de proteína na célula de reação. FONTE: A autora (2009).

6. CONCLUSÕES

- A uridililação de proteína GlnB é necessária para a ativação de NifA;
- A proteína GlnB de *A. brasilense* é estável ao tratamento térmico de 80°C-3 minutos;
- As substituições V100A e Y51F não causaram alteração substancial da estrutura trimérica de GlnB, sugerindo que estes resíduos não são importantes para a manutenção da estrutura quaternária de GlnB;
- A substituição do resíduo L13P provavelmente leva a uma alteração da estrutura quaternária de GlnB de *A. brasilense*, sugerindo que o resíduo L13 é importante para a estabilização da proteína na forma trimérica;
- Os trímeros híbridos GlnB₂/GlnBUMP e GlnB/GlnBUMP₂ não são estáveis em solução;
- As proteínas PII de *A. brasilense* não são capazes de formar heterotrímeros, sugerindo que neste organismo a regulação fina das atividades de GlnB e GlnZ através de formação de heterotrímeros não é necessária provavelmente devido a sua segregação funcional;
- A alteração V100A levou a uma mudança conformacional na proteína GlnB que desfavorece sua uridililação, enquanto a mutação L13P e Y51F produziu proteínas GlnB incapazes de ser uridililadas por GlnD;
- A proteína GlnB possui três sítios de ligação de 2-oxoglutarato que exibem cooperatividade negativa. As constantes de dissociação determinadas por titulação calorimétrica isotérmica foram Kd1= 6,7 µmol/L, Kd2= 97,8 µmol/L, Kd3= 30,3 µmol/L;

- A proteína GlnB de *A. brasilense* provavelmente possui três sítios de ligação ATP e o valor da constante de dissociação foi $K_{d1} = 3,7 \mu\text{mol/L}$. A proteína GlnB de *A. brasilense* apresenta maior afinidade pela ligação do ATP do que para o ADP;
- A proteína GlnB de *A. brasilense* não liga ADP ou AMP na presença de 2-oxoglutarato;
- As substituições V100A e Y51F não alteram a capacidade da proteína GlnB de se ligar ao 2-oxoglutarato, mas reduz a afinidade de ligação de GlnB ao ATP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, L.M., HUERGO, L.F., INVITTI, A.L., GIMENES, C.I., BONATTO, A.C., MONTEIRO, R.A., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., CHUBATSU, L.S. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.41, n.4, p.289-294, 2008.
- ARCONDEGUY, T., JACK, R., MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, v. 178, p.4830-4838, 1996.
- ASHBY, G.A., THORNELEY, R.N. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Kinetic studies on the Fe protein involving reduction by sodium dithionite, the binding of MgADP and a conformation change that alters the reactivity of the 4Fe-4S centre. **Biochem. J.** v.1, n.246(2), p.455-465, 1987.
- ATKINSON, M. R., NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v.32, n. 2, p. 301-313, 1999.
- ATKINSON, M. R.; BLAUWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Context-dependent functions of the PII and GlnK signal transduction proteins in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5364-5375, 2002
- BARBIERI, P., GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Res. Microbiol.** v. 144, p. 69–75, 1993.
- BASHAN, Y., SINGH, M., LEVANONY, H. Contribution of *A. brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Can. J. Bot.** v.67, p.2429-2434, 1989.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 103-121, 1997.
- BECKERS, G., STRÖSSER, J., HILDEBRANDT, U., KALINOWSKI, J., FARWICK, M., KRÄMER, R., BURKOVSKI, A. Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. **Mol Microbiol.** v.58, n.2, p.580-595, 2005.
- BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.** v. 269, n. 13, p. 3296-303, 2002.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant Soil** v. 95, n. 1, p. 109-121, 1986.

BONATTO, A.C., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., YATES, M.G., BENELLI, E.M. Effect of T- and C-loop mutations on the *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein in nitrogen signalling. **Res. Microbiol.** v.156, n.5-6, p.634-640,2005.

BONATTO, A.C., COUTO, H., SOUZA, E.M., ARAÚJO, L.M., PEDROSA, F.O., NOINDORF, L., BENELLI, E.M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expr. Purif.** v. 55, n.2, p.293-29,2007.

BOZOUKLIAN, H., ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimie.**, v. 68, n. (10-11), p 1181-1187, 1986.

BOZOUKLIAN, H., FOGHER, C., ELMERICH, C. Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v.137, n. 1, p. 3-18, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARR, P. D. X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 52, p. 93-104, 1996.

CHAVES, D.F., FERRER, P.P., DE SOUZA, E.M., GRUZ, L.M., MONTEIRO, R.A., PEDROSA, F.O. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**. v.7, n.20, p.:3759-3763, 2007.

CHEAH, E., CARR, P.D., SUFFOLK, P.M., VASUDEVAN, S.G., DIXON, N.E., OLLIS, D.L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**. v.15, n.2(10), p. 981-990, 1994.

COLNAGHI, R., RUDNICK, P., HE, L., GREEN, A., YAN, D., LARSON, E., KENNEDY, C. Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* is suppressible by prevention of glutamine synthetase adenylation. **Microbiology**, v. 147, p.1267-1276, 2001.

CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X. D.; BULLOUGH, P. A.; WINKLER, F. K.; MERRICK, M. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v.104(4) p. 1213-8, 2007.

- CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; BALI, A.; BLANCO, G.; GARCIA, E.; BUSH, G.; KENEDY, C.; MERRICK, M. The product of nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 7741-7749, 1991.
- COUTTS, G., THOMAS, G., BLAKEY, D., MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 15, n. 21(4), p. 536-545, 2002.
- DE ZAMAROCZY, M., DELORME, F., ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Mol. Gen. Genet.** v. 224, n. 3, p.421-430, Dez 1990.
- DE ZAMAROCZY, M., PAQUELIN, A., ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 175, n.9, p. 2507-2515, Mai 1993.
- DE ZAMAROCZY, M., PAQUELIN, A., PELTRE, G., FORCHHAMMER, K., ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol.** v. 178, n. 14, p. 4143-4149, 1996.
- DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 2, p. 449-463, 1998.
- DEKHIL, B. S.; CAHILL, M.; STACKEBRANT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomibilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. Nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *paroensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 72-77, 1997.
- DIDONET, A. D., MARTIN-DIDONET, C. C.G., GOMES, G. F. Avaliação de Linhagens de Arroz de Terras Altas Inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A.brasilense* Sp245. 2003.**EMBRAPA**. Disponível em: www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/comunicadotec/comt_69.pdf. Acesso: 22 de fevereiro de 2008.
- DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochim. Biophys. Acta.** v.31, n. 127(2), p. 285-294, 1966.
- DIXON, R., KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, n. 8, p. 621-631, 2004.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. **Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites.** In:

NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. (Eds). Proc. of the 1st. Intl. Symp. Nitrogen Fixation. Pullman: Washington Univ. Press, 1976. v.2, p.518-38.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Springer-Verlag: Science Tech Publishers, 1987.

DURAND, A., MERRICK, M. *In vitro* analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. **J. Biol. Chem.** v. 6, n. 281(40), p.29558-29567, 2006.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 1, p. 17-26, 2001.

EDWARDS, R.; MERRICK, M. The role of uridylyltransferase in the control of *Klebsiella pneumoniae nif* gene regulation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 247, p. 189-198, 1995.

ENGLEMAN, E. G., FRANCIS, S. H. Cascade control of glutamine synthetase. II. Metabolic regulation of the enzymes in the cascade. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 191, p. 602–612, 1978.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *A. brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 281 – 288, 1999.

FAGES, J.. *Azospirillum* inoculants and field experiments,. In Y. Okon (ed.), **Azospirillum/plant associations**. CRC Press, Boca Raton, Flórida p. 87-109. 1994.

FANI, R., ALLOTTA, G., BAZZICALUPO, M., RICCI, F., SCHIPANI, C., POLSINELLI, M. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein (*nifH*) of *Azospirillum brasilense* and identification of a region controlling *nifH* transcription. **Mol. Gen. Genet.**, v. 220, n. 1, p. 81-87, 1989.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU de MARSAC, N. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N status. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 84–91, 1994.

FORCHHAMMER, K., A. HEDLER, H. STROBEL e WEISS, V. Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. **Mol. Microbiol.** v. 33, p.338–349, 1999.

FORCHHAMMER, K. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends in Microbiol.** v.16, n.2, p.65-72, 2008.

FOSTER-HARTNETT, D., e KRANZ. R. G. The *Rhodobacter capsulatus*

glnB gene is regulated by NtrC at tandem *rpoN*-dependent promoters. **J. Bacteriol.** v.176, p.5171–5176, 1994.

FU, H.A., HARTMANN, A., LOWERY, R. G., FITZMAURICE, W. P., ROBERTS, G.P., BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 9, p. 4679-4685, Set 1989.

GENSCRIPT. Disponível em:

http://www.genscript.com/site2/document/5322_20080813063105.JPG. Acesso em 01 maio 2009.

GRUSWITZ F, O'CONNELL J 3RD, STROUD RM. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 104(1), p. 42-7, 2007.

HAGEMAN, R. V., BURRIS, R. H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** . v. 75, n. 6, p. 2699-2702, 1978.

HALBLEIB, C. M., LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **J. Nutr Review.** v. 130, n.5, p.1081-1084, 2000.

HARTMANN, A, KLEINER, D. Ammonium (methylammonium) transport by *Azospirillum* spp. **FEMS Microbiology Lett.**, v. 15, n. 1, p. 65 – 67, 1982

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.** v. 165, n. 3, p. 864-870, 1986.

HARTMANN, A., BALDANI, J.I. **The genus *Azospirillum***. The prokaryotes (5): p.115-140. Springer New York, 2006.

HEINRICH, A., WOYDA, K., BRAUBURGER, K., MEISS, G., DETSCH, C., STÜLKE, J., FORCHHAMMER, K. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 17, n. 281(46), p. 34909-34917, 2006.

HESKETH, A., FINK, D., GUST, B., REXER, H.U., SCHEEL, B., CHATER, K., WOHLLEBEN, W., ENGELS, A.. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 319-330, 2002.

HOLTEL, A. H. e M. MERRICK. Identification of the *Klebsiella pneumoniae* *glnB* gene: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles. **Mol. Gen. Genet.** v.215, p. 134–138, 1988.

HOWARD, J.B., REES, D.C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.

HSIEH, M. H., LAM, H. M., VAN DE LOO, F. J., CORUZZI, G. A. PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 10, n. 95 (23), p. 13965-13970, 1998.

HUERGO, L. F. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense***. Curitiba, 2006. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HUERGO, L. F., SOUZA, E. M., STEFFENS, M. B., YATES, M. G., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 6, n. 223 (1), p. 33-40, 2003.

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B.; MERRICK, M. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Lett.** v.580(22), p. 5232-6, 2006.

HUERGO, L. F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; ARAUJO, L.M.; SOUZA, E. M. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Mol. Microbiol.** v. 66(6), p. 1523-35, 2007.

HUERGO, L.F., MERRICK, M., MONTEIRO, R.A., CHUBATSU, L.S., STEFFENS, M.B., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M. In vitro interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **J. Biol. Chem.** v.13, n.284(11), p. 6674-6682, 2009.

INABA, J. **Envolvimento das proteínas GlnB e GlnZ na regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 2005 112f. Dissertação (mestrado em Ciências-Bioquímica)- Setor de Ciências Biológica, Universidade Federal do Paraná.

ISHIDA, M. L.; ASSUMPÇÃO, M. L.; MACHADO, E. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Identification and characterization of two-components NtrX/NtrY regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 651-661, 2002.

JAGGI, R., YBARLUCEA, W., CHEAH, E., CARR, P. D., EDWARDS, K. J., OLLIS, D., VASUDEVAN, S. G. The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*. **FEBS Lett** v. 391, p. 223–228, 1996.

JAGGI, R., VAN HEESWIJK, W. C., WESTERHOF, H. V., OLLIS, D. L., VASUDEVAN, S. G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains with intramolecular signal transduction. **EMBO J.**;v.16, p.5562–5571,1997.

JAIN, D.K., PATRIQUIN, D.G. Root Hair Deformation, Bacterial Attachment, and Plant Growth in Wheat-*Azospirillum* Associations. **App. Env. Microbiol.**, p. 1208-1213, 1984.

JAKOBY, M., KRÄMER, R., BURKOVSKI, A. Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterisation of corresponding proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 173, p. 303–310, 1999.

JAVELLE, A., SEVERI, E., THORNTON, J., MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.** v. 5, n. 279 (10), p. 8530-8538, 2004.

JIANG, P., ZUCKER, P., NINFA, A.J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. **J. Bacteriol.**, v. 179, p.4354–4360, 1997.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, p.12782-12794, 1998 (a).

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 37, p. 12795-12801, 1998 (b).

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of adenylation state. **Biochemistry**. v. 37, p. 12802-12810, 1998c.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 6, p. 1906–1911, 1999.

JIANG, P., MAYO, A.E., NINFA, A.J. *Escherichia coli* glutamine synthetase adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49): kinetic characterization of regulation by PII, PII-UMP, glutamine, and alpha-ketoglutarate. **Biochemistry**. v.3, n.46(13), p.4133-4146, 2007 (a).

JIANG, P., NINFA, A.J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. **Biochemistry**. v. 13, n.46(45), p.12979-12996, 2007 (b).

KAMBEROV, E. S., ATKINSON, M. R., CHANDRAN, P., NINFA, A. J. Effect of mutations in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. **J. Biol. Chem.** v. 11, n. 269 (45), p. 28294-28299, 1994.

- KAMBEROV, E. S., ATKINSON, M. R., NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 17797 – 17807, 1995.
- KEENER, J., e KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NtrC. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. v. 85, p. 4976–4980, 1988.
- KHAMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, v. 140, p. 45-55, 1989.
- KIM, I. H., KWAK, S. J., KANG, J. S., PARK, S. C. Transcriptional control of the *glnD* gene is not dependent on nitrogen availability in *Escherichia coli*. **Mol. Cells**, v. 8, p. 483–490, 1998.
- KLASSEN, G., DE SOUZA, E. M., YATES, M. G., RIGO, L. U., INABA, J., PEDROSA, F. DE O. Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n.22, p. 6710-6713, 2001.
- KLASSEN, G., SOUZA, E. M., YATES, M. G., RIGO, L. U., COSTA, R. M., INABA, J., PEDROSA, F. O. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signal transducing protein. **App. Env. Microbiol.** v. 71, p. 5637-5641, 2005.
- KUSTU, S.; HIRSHMAN, J.; BURTON, D.; JELESKO, J.; MEEKS, J. C. Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. **Mol. Gen. Genet.**, v. 197, p. 309-317, 1984.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.
- LIANG, Y. Y., DE ZAMAROCZY, M., ARSENE, F., PAQUELIN, A., ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 79, p. 113 – 119, 1992.
- LIN, W., OKON, Y., HARDY, R.W.F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.45, p.1775–1779, 1983.
- LOWE, D.J., FISHER, K., THORNELEY, R.N. *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase: pre-steady-state absorbance changes show that redox changes occur in the MoFe protein that depend on substrate and component protein ratio; a role for P-centres in reducing dinitrogen? **Biochem. J.**, v.15;n. 292 , p.93-98, 1993.

LOWERY, R. G., SAARI, L. L., LUDDEN, P. W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation *in vitro*. **J. Bacteriol.**, v. 166, n.2, p. 513-518, 1986.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 549-553, 1991.

MACHADO, H. B., YATES, M. G., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 674-684, 1995.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Ann. Acad. Bras.Cienc.**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and postranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. **J. Bacteriol.** v. 184, p. 2251-2259, 2002.

MARTIN-DIDONET, C.C.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; KLEINA, M.; REGO, F. G.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Genome structure of the genus *Azospirillum*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 14, p. 4113-6, 2000.

MASEPOHL, B., KREY, R., KLIPP, W. The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, n. 11, p. 2667-2675, 1993.

MARINI, A.M.; MATASSI, G.; RAYNAL, V.; ANDRE, B., CARTRON, J. P., CHERIF-ZAHAR, B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. **Nat. Genet.** v. 26, p. 341-344, 2000.

MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single strand DNA "blue" T7 promoter plasmids a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Prot. Eng.**, v.1, p. 67-74, 1986.

MERRICK, M. J., EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L.S. *In-trans* regulation of the N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999

- MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ_{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action of phylogenetic relationship of their functional domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 1993.
- MUÑOZ-CENTENO, M.C., RUIZ, M.T., PANEQUE, A., CEJUDO, F.J. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by fixed nitrogen in *Azotobacter chroococcum*. **Biochim Biophys Acta**. v.29, n.1291 (1), p.67-74, 1996.
- NEUHARD, J., e NYGAARD, P. in ***Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*** (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E., eds) Vol. 1, pp. 445–473, 1987. ASM Press, Washington, D. C.
- NINFA, A. J. Regulation of gene transcription by extracellular stimuli. In: Neidhardt FC, *et al.*, editors. ***Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology***. Washington, D.C.: ASM Press; p. 1246–1262, 1996.
- NINFA, A.J ATKINSON, E. S. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v.4, p. 172-9, 2000.
- NORDLUND, S.; Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification. **Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of a biological process**. Horizon Scientific Press, 2000.
- O' CONNELL, K. P., RAFFEL, S. J., SAVILLE, B. J., HANDELSMAN, J. Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. **Microbiology**, v. 144, p. 2607–2617, 1998.
- OKON, Y., ALBRECHT, S. L. , BURRIS, R. H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.**, v. 127, n. 3, p. 1248-1254, 1976.
- OKON, Y., LABANDERA-GONZÁLEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem.** v. 26, p. 1591-1601, 1994.
- PARKINSON, J. S.; KOFOID, E. C.; Communication modules in bacterial signalling proteins. **Annu. Rev. Gen.**, v. 26, p. 71-112, 1992.
- PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; de BRUIJN, F. J. Characterisation of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 124-138, 1991.
- PEDROSA, F., YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PERLOVA, O., URETA, A., NORDLUND, S., MELETZUS, D. Identification of three genes encoding P(II)-like proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus*: studies of their role(s) in the control of nitrogen fixation. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 19, p.5854-5861, 2003.

PIOSZAK, A. A., P. JIANG e NINFA, A. J.. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. **Biochemistry**. v.39, p.13450–13461,2000.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 252p.

REDDY, P. M.; LADHA, J. K. Nitrogen fixation in rice:objectives and achievements. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G. M.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 641-646. (Current Plant Science and Biotechnology in griculture, 38).

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; de LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J.Syst. Bacteriol.**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REITZER, J. L.1996. **Ammonia assimilation and the biosynthesis og glutamine, glutamate, aspartate, asparagines, L-alanine, and D-alanine**. p. 391-407. In: F.C. Neidhardt *et al.*,(ed), *Escherichia coli* and *Salmonella*:cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New york: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHELESSMAN, J.; HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structure of ADP-AIF4--stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, v.387, p. 370-376, 1997.

SCHNEIDER, D.A., GOURSE, R.L. Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: a bioassay for available cellular ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 27, n. ;279(9), p.:8262-8268, 2004.

SCHOLLHORN, R., BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N-2 fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**,v. 58, n. 1, p. 213-216, 1967.

SCHRANK, I. S., ZAHA, A., DE ARAUJO, E. F., SANTOS, D.S. Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a

recombinant containing the *nif* structural genes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p.321-330, 1987.

SENIOR, P.J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique. **J. Bacteriol.** v. 123, p.407-410, 1975.

SHAPIRO, B. M., STADTMAN, E., R. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 30, p. 32-37, 1968.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **BioTechnology**. v.1, p. 784-791, 1983.

SMITH, C.S., WELJIE, A.M., MOORHEAD, G.B. Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v. 33, n. 2, p.353-60, 2003.

STADTMANN, E. R. Discovery of glutamine synthetase cascade. **Methods Enzymol.** v.182, p.793-809, 1990

STEENHOUDT, O., VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 4, p. 487-506, 2000.

STROSSER, J., LUDKE, A., SCHAFFER, S., KRAMER, R., BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Mol. Microbiol.** v. 54, p.132-147, 2004.

STOCK, J. B., NINFA, A. J. e STOCK, A M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p.:450–490, 1989.

TARRAND, J. J., KRIEG, N. R., DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol**, v. 24, n. 8, p.967-80, 1978.

THOMAS, G., COUTTS, G., MERRICK, M. The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends Genet.**, v.16, p.11-14, 2000

TREMBLAY, P.L., DREPPER, T., MASEPOHL, B., HALLENBECK, P.C. Membrane sequestration of PII proteins and nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v.189, n.16, p.5850-5859, 2007

UPCHURCH, R.G., MORTENSON, L.E. *In vivo* energetics and control of nitrogen fixation: changes in the adenylate energy charge and adenosine 5'-

diphosphate/adenosine 5'-triphosphate ratio of cells during growth on dinitrogen versus growth on ammonia. **J. Bacteriol.** v.143, n. 1, p. :274-284, 1980.

VAN DOMMELEN, A., KEIJERS, V., VANDERLEYDEN, J., DE ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 180, n.10, p.2652-2659,1998.

VAN DOMMELEN, A., KEIJERS, V., SOMERS, E., VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol. Genet. Genomics**, v. 266, n. 5, p. 813-820, 2002.

VAN DOMMELEN, A., SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J. Identification of the glutamine synthetase adenylyltransferase of *Azospirillum brasilense*. **Res Microbiol.** v.160(3), p.205-212,2009.

VAN HEESWIJK, W. C., S. HOVING, D. MOLENAAR, B. STEGEMAN, D. KAHN, e WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 133-146, 1996.

VAN HEESWIJK, W. C., WEN, D., CLANCY, P., JAGGI, R., OLLIS, D. L., WESTERHOFF, H. V., VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers in vivo: fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; v. 97, p. 3942–3947, 2000.

VASUDEVAN, S.G., GEDYE, C., DIXON, N.E., CHEAH, E., CARR, P.D., SUFFOLK, P.M., JEFFREY, P.D., OLLIS, D.L. *Escherichia coli* PII protein: purification, crystallization and oligomeric structure. **FEBS Lett.** v337, p.255-258, 1995.

VITORINO, J. C.; STEFFENS, M. B. R.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Potencial roles for the *glnB* and *ntrXY* genes in *A. brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 201, p. 199-204, 2001.

VOLKMAN, B.F., NOHAILE, M. J., AMY, N. K., KUSTU, S., WEMMER, D.E. 3-Dimensional solution structure of the N-terminal receiver domain of NtrC. **Biochemistry**, v. 34, p. 1413–1424,1995.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil.** v.210, n. 1,p.103-113, 1999.

WEISS, V.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 85, p. 8919-8923, 1988.

WEISS, V., F. CLAVERIE-MARTIN e MAGASANIK, B.. Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to

DNA essential for activation of transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 89, p.5088–5092, 1992.

WESTBY, C. A., ENDERLIN, C. S., STEINBERG, N. A., JOSEPH, C. M., MEEKS, J. C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **J. Bacteriol.**, v.169, n. 9, p. 4211-4214, 1987.

WOLFE, D.M, ZHANG, Y., ROBERTS, G.P. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v.189, n. 19, p.6861-9, 2007.

WYMAN, C., I. ROMBEL, A. K. NORTH, C. BUSTAMANTE, e KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancerbinding protein. **Science**, v. 275, p.1658–1661, 1997.

XIE, C.H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.55, p. 1435-1438, 2005.

XU, Y., CHEAH, E., CARR, P. D., VAN HEESWIJK, W. C., WESTERHOFF, H.V., VASUDEVAN, S. G., OLLIS, D.L.GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J. Mol. Biol.**,v. 11, n. 282(1), p. 149-165, 1998.

XU, Y., CARR, P.D., HUBER, T., VASUDEVAN, S.G., OLLIS, D.L.The structure of the PII-ATP complex. **Eur J Biochem.**, v.268(7), p.2028-2037, 2001.

YAMASHITA, M. M., ALMASSY, R. J., JANSON, C.A., CASCIO, D., EISENBERG, D. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5Å resolution. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 17681–17690, 1989.

YILDIZ, O., KALTHOFF, C., RAUNSER, S., KÜHLBRANDT, W. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. **EMBO J.** v.24, n. 26(2), p. 589-599, 2007.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY,G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. London:Chapman e Hall, New York, 1992. p.43-86.

ZHANG, Y., R. H. BURRIS, P. W. LUDDEN, G. P. ROBERTS. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol.** v. 175, p.6781–6788,Nov 1993.

ZHANG, Y., BURRIS, R. H., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 10 , p. 2948-2953, Mai 1996.

ZHANG, Y., BURRIS, R. H., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 15, n. 152 (2), p.195-204, Jul 1997.

ZHANG, Y., POHLMANN, E.L., LUDDEN, P.W., ROBERTS, G.P. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 983-992, 2000.

ZHANG, Y., WOLFE, D.M., POHLMANN, E.L., CONRAD, M.C., ROBERTS, G.P. Effect of AmtB homologues on the post-translational regulation of nitrogenase activity in response to ammonium and energy signals in *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**. v. 152, p. 2075-2089, 2006.

ZHU, Y., CONRAD, M.C., ZHANG, Y., ROBERTS, G.P. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals. **J. Bacteriol.** v.188, n.5, p.1866-1874. 2006.